UNIVERSITE DE PARIS
Année 1968-1969

FACULTE DE PHARMACIE
Série U – N° 468

THESE

PRESENTEE

A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS
(Mention Pharmacie)

PAR

Annie DEVISSAGUET-LELONG

Soutenue le ..... 1969 .....

TITRE DE LA THESE

ETUDE SUR L'IMMUNITE PASSIVE, OBTENUE PAR ADMINISTRATION DE SERUMS ANTITOXIQUES, PURIFIES OU NON, PAR DIVERSES VOIES.
(Intraveineuse, intramusculaire, rectale)

Jury :

Mlle S. LAMBIN	Président
Mr A. GERMAN Mr J. SAVEL	Examinateurs

UNIVERSITE DE PARIS
Année 1968-1969

FACULTE DE PHARMACIE
Série U – N° 468

THESE

PRESENTEE

A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS
(Mention Pharmacie)

PAR

Annie DEVISSAGUET-LELONG

Soutenue le .....

TITRE DE LA THESE

ETUDE SUR L'IMMUNITE PASSIVE, OBTENUE PAR ADMINISTRATION DE SERUMS ANTITOXIQUES, PURIFIES OU NON, PAR DIVERSES VOIES.
(Intraveineuse, intramusculaire, rectale)

Jury :

Mlle S. LAMBIN	Président
Mr A. GERMAN Mr J. SAVEL	Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MALANGEAU P.	DOYEN,
GUILLOT M.	Assesseur, O +
DELAVEAU P.	Assesseur
RODINEAU L.	Secrétaire Général, +
FERRARI (Mme S.)	Attaché Principale
JEANDEL L.	Attaché,
ESPINASSE (Mme M.-L.)	Attaché,
BRENN A.	Attaché, +
JACOB A.	Attaché, +
MUR (Mme A.-M.)	Attaché,
FRIZOL (Mle E.)	Attaché
TRICAN J.	Attaché

PROFESSEURS HONORAIRES

LAUNOY L.	O +,
FLEURY P.	O +,
PICON M.	O +,

PROFESSEURS

JANOT M.-M., O +, Membre de l'Institut	Pharmacie Glénique (T)
VALETTE G., O +	Pharmacodynamie (T)
PARIS R. +,	Matière Médicale (T)
GUILLOT M., O +,	Physique (T)
GAUTIER J.-A., O +,	Chimie Organique (T)
LAMBIN (Mle S.) +,	Microbiologie (T)
RAOUL Y., +,	Physiologie (T)
COURTOIS J., +,	Chimie Biologique (T)
DOMANGE L., O +,	Chimie Générale et Minérale (T)
TRUHAUT R., O +, Membre de l'Institut	Toxicologie (T)
MORETTE A., +,	Hydrologie (T)
CAVIER R., +,	Parasitologie (T)
QUEVAUVILLER A., +,	Hygiène et Education Sanitaire (T)
MOREAU R., +,	Pharmacie Chimique (T)
GERMAN A.,	Virologie et Sérologie (T)
PIETTE M., +,	Biologie Sanguine, Hématologie (T)
MALANGEAU P.	Chimie Analytique (T)
GIRARD M., +,	Biochimie Appliquée (T)
DILLEMANN G.,	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
DEYSSON G.,	Botanique (T)
MICHEL R.,	Endocrinologie (T)
FLAHAUT J.	Minéralogie (T)

RENAULT J.,	Chimie Organique (T)
LE HIR A.,	Pharmacie Galénique (T)
BOUDENE C.,	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
DELAVEAU P.,	Matière Médicale et Séméiologie (T)
LARUELLE P.,	Physique (T)
ROSSIGNOL P.,	Pharmacodynamie (T)
MANGEOT A.,	Pharmacie Galénique Industrielle
COHEN Y.,	Pharmacodynamie
RENAULT H.,	Physique
BOURDON R.,	Chimie Analytique
REYNAUD P.,	Pharmacie Chimique
LE MOAN R.,	Toxicologie
POISSON J.,	Pharmacie Galénique
LECLERC M.	Hématologie
SAVEL J.	Biologie
PERCHERON F.	Chimie biologique

MAITRES DE CONFERENCES

PAOLETTI C.	Toxicologie
DESVIGNES A.	Cryptogamie et Technique Bactériologique
BORY M.	Microbiologie
MIOCQUE M.	Chimie organique
GUIGNARD J.L.	Botanique Générale
GOUNELLE J.C.	Physiologie
BINET P.	Biologie Animale
COMBET-FARNOUX C.	Chimie Organique
PLAT (Mme M.)	Législation et Déontologie Pharmaceutique
DELACOUX E.	Pharmacie Chimique
ADOLPHE C.	Physique
GUERNET M.	Chimie analytique et Bromatologie
DIDRY J.	Mathématiques
KHODADAD P.	Chimie Minérale et Minéralogie
PERLES R. (F.F.)	Chimie Biologique
YONGER J. (F.F.)	Chimie Analytique
RIVET J. (F.F.)	Chimie générale et Minérale
HAZEBROUCQ (F.F.)	Physique
ETIENNE J. (F.F.)	Mathématiques
MESTRE J (F.F.)	Botanique
BOURRINET P. (F.F.)	Hygiène Education Sanitaire
SOULEAU Ch. (F.F.)	Chimie générale et Minérale

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

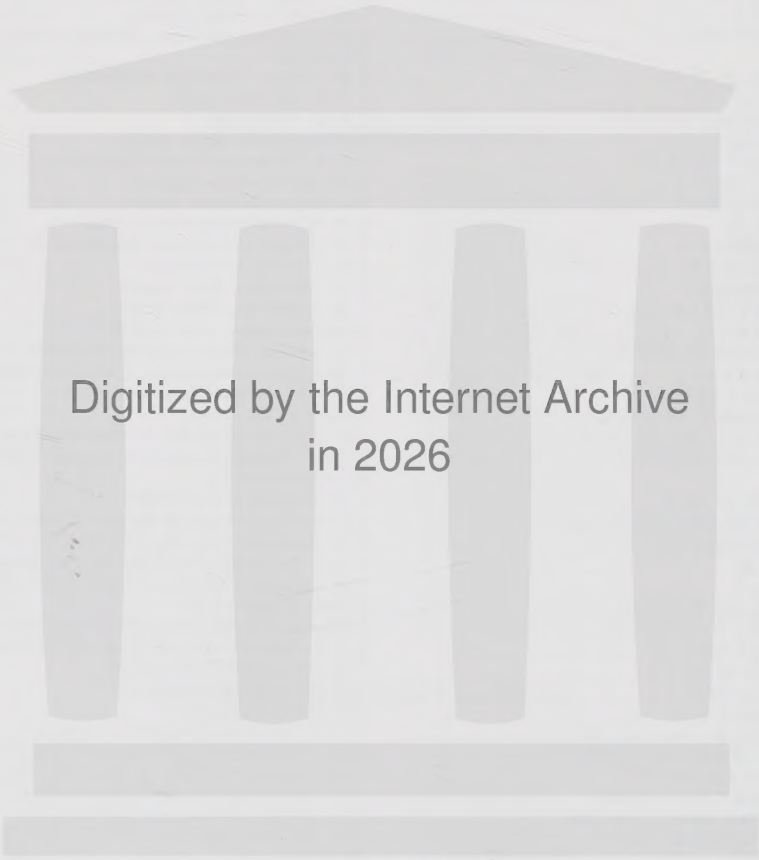
AGNERAY J.	T.P. Chimie Biologique 3ème Année
ASTIN C. (F.F.)	T.P. Physique 1ère Année
BARNIER (Mle S.) (F.F.)	Mathématiques
BERNARD (Mle J.)	T.P. Microbiologie
BESANCON P. (F.F.)	Mathématiques
BIGET (Mme M.P.) (F.F.)	Mathématiques
BLANC (Mme J.)	E.D. Chimie Organique
BONALY (Mme J.) (F.F.)	T.P. Botanique
BOURNIQUE (Mle C.) (F.F.)	T.P. Physiologie Végétale 2ème Année
BRALET M. (F.F.)	T.P. Zoologie 1ère Année
CARLIER A.	C.E.S. Pharmacie Galénique Industrielle
CARRE D. (F.F.)	Chaire de Physique (Mathématiques)
CENAC (Mme J.) (F.F.)	C.E.S. Parasitologie Pharmaceutique et Technique
CHARPENTIER (Mme M.)	E.D. Chimie Minérale et Générale 1ère Année
CHOIX (Mle M.)	T.P. Pharmacie Galénique 3ème Année
CLAIR (Mle G.) (F.F.)	E.D. Essais des drogues végétales
COMPAGNON P. (F.F.)	E.D. Chimie Organique
DAGRON Ch.	E.D. Chimie Générale et Minérale 2ème Année
DAVY J. (F.F.)	C.E.S. Biochimie

DECAUDIN (Mle M. Th.)	T.P. Parasitologie 4ème Année
DELCOURT A. (F.F.)	T.P. Botanique
DREUX C.	C.E.S. Electrochimie Appliquée à l'Analyse
DUMANT (Mle G.)	C.E.S. Contrôle des Médicaments (Physico-Chimie)
DUCLOS J.P.	Chaire de Chimie Organique
DUPONT (Mme Ch.)	T.P. Pharmacodynamie 4ème Année
ETIENNE G.	T.P. Pharmacie Galénique 2ème et 3ème Années
FAURE (Mme L.) (F.F.)	E.D. Chimie Organique 1ère Année
FLEURY (Mle S.)	E.D. Chimie Analytique Qualitative
FOGLIETTI (Mle A.M.) (F.F.)	T.P. Chimie Biologique 3ème et 4ème Années
GAYRAL P. (F.F.)	Zoologie 1ère Année
GOURSAT (Mle M.J.) (F.F.)	E.D. Botanique 1ère Année
HAMON M.	T.P. Chimie Analytique Quantitative
HARISPE J.	T.P. Chimie Organique 2ème Année
HENRY J.	T.P. Chimie 4ème Année
HUBERT (Mme J.)	C.E.S. Bactériologie Pharmaceutique et Technique
JULIEN R. (F.F.)	E.D. Chimie Générale et Minérale
JUND (Mle Y.)	C.E.S. Microbiologie
LALEGERIE P. (F.F.)	C.E.S. Biochimie
LAROCHE J.	T.P. Physique 2ème Année
LEBOEUF M. (F.F.)	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique
LEDUC (Mme Y.)	T.P. Chimie 4ème Année
LEGER (Mme N.)	Parasitologie 4ème Année
LELUC R.	T.P. Microbiologie 4ème Année
LEMONNIER A.	T.P. Chimie Analytique Quantitative
LEVILLAIN P.	E.D. Chimie Analytique
LIKFORMAN J.	E.D. Physique 1ère Année
LONGEVIALLE (Mle M.)	E.D. Botanique 1ère Année
MACCARIO J. (F.F.)	Mathémathiques 1ère Année
MAHUZIER G. (F.F.)	T.P. Chimie Analytique Qualitative
MANDEREAU J.	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique
MARTIN FRERES H.	T.P. Chimie Minérale 1ère Année
MAUGUEN Y. (F.F.)	Chaire de Physique
MICHELET (Mle A.) (F.F.)	E.D. Chimie Générale et Minérale 2ème Année
MORIN (Mle H.)	C.E.S. Pharmacodynamie et Essais Biologiques des Médicaments
MOULIN P. (F.F.)	T.P. Physique 1ère Année
N'GUYEN PHU LICH (F.F.)	C.E.S. Toxicologie et Etudes Sanitaires
NOTTEGHEM (Mme J.) (F.F.)	T.P. Zoologie 1ère Année
PARIS M.	C.E.S. Contrôle des Médicaments (Biologie)
PESTIS J.	T.P. Anatomie et Physiologie 2ème Année
POULLAIN P.	C.E.S. Hématologie
QUENEZ P. (F.F.)	Chaire de Chimie Générale et Minérale
ROBERT (Mme M.)	C.E.S. Immunologie Générale et Appliquée
RODIER N. (F.F.)	T.P. Physique 2ème Année
ROLLEN (Mle A.)	T.P. Botanique 1ère Année
ROUSSELET F.	Biochimie Appliquée
ROUSSELET (Mle R.) (F.F.)	T.P. Essais des Drogues Végétales
SEILLER (Mme M.) (F.F.)	C.E.S. Pharmacie Galénique et Industrielle
STRUPLER (Mle N.)	T.P. Chimie Générale et Minérale 1ère Année
THUONG CONG TRIEU.	T.P. Chimie Analytique Quantitative
TROUPEL (Mle S.) (F.F.)	T.P. Chimie Analytique Qualitative
VIERFOND J.M. (F.F.)	E.D. Chimie Organique 1ère et 2ème Années
VILLERS J. (F.F.)	Physique

BIBLIOTHEQUE

RUYSSEN (Mle Y.)	Conservateur en Chef +,
LAVAUD (Mle S.)	Conservateur +,
DESGRIPPES (Mme A.)	Conservateur
BOUVRESSE (Mle A.M.)	Bibliothécaire

+ Légion d'Honneur
0 Officier
C Commandeur


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523711_0036

A Mademoiselle S. LAMBIN
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Membre de l' Académie de Pharmacie

qui a bien voulu nous faire l'honneur
de présider cette thèse

A Monsieur A. GERMAN
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Membre de l'Académie de Pharmacie

A Monsieur J. SAVEL
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

qui ont accepté de juger ce travail.

En hommage de respectueuse gratitude.

A Mademoiselle S. LAMBIN

Professeur de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Paris
Chevalier de la Légion d'Honneur
Membre de l'Académie de Pharmacie

qui nous a accueillie dans son laboratoire et nous a prodigué tant de marques d'intérêt et de bienveillance.

En hommage de profonde reconnaissance
et de respectueux attachement.

A Monsieur J. SAVEL
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

qui s'est montré pour nous un maître et un ami, en nous initiant à la recherche, et nous faisant bénéficier de son expérience, de ses conseils et de ses encouragements.

En hommage d'affectueuse reconnaissance
et de profond attachement.

A mon père,
A mon mari,

qui m'ont conseillée et encouragée tout au long de ce travail,

A ma mère,
A mes enfants,

en témoignage de profonde affection,

A ma famille,
A mes amis.

Nous ne saurions commencer cet exposé sans remercier nos Maîtres Hospitaliers :

Monsieur le Doyen G. VALETTE
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

Monsieur le Professeur R.G. DOURIS

Monsieur C. DREUX
Pharmaciens Chefs des Hopitaux de Paris

■

Nous exprimons notre reconnaissance également :

Au " Rijks Instituut Voor Volksgezondheid ", à Utrecht, qui nous a fourni un sérum antidiphtérique purifié, de Mouton.

Au " National Institute of Health ", à Bethesda, qui nous a fourni la toxine diluée pour réaction de Schick.

A " l'Institut Ronchèse ", à Nice, qui nous a préparé un sérum antidiphtérique non purifié, de Mouton.

■

Il nous est également agréable d'exprimer nos remerciements à tous nos camarades d'Internat, et à tous ceux qui, à des titres divers, nous ont aidée au cours de ce travail.

ETUDE SUR L'IMMUNITE PASSIVE, OBTENUE PAR ADMINISTRATION DE SERUMS ANTITOXIQUES, PURIFIES OU NON, PAR DIVERSES VOIES

(INTRAVEINEUSE, INTRAMUSCULAIRE, RECTALE)

INTRODUCTION

La sérothérapie antitoxique utilise la propriété des antitoxines, de neutraliser in vivo les toxines. Elle apporte à l'organisme, en quantités plus ou moins massives, des anticorps élaborés en dehors de lui et qui seront peu à peu éliminés, selon les processus métaboliques normaux.

Son application fait appel à l'emploi de sérums de donneurs humains ou d'animaux hyperimmunisés par les diverses toxines bactériennes ou leurs dérivés atoxiques.

Ces derniers subissent, après leur récolte, un certain nombre de traitements physicochimiques destinés à obtenir, d'une part une activité spécifique maximum, d'autre part une toxicité minimum par unité d'utilisation. Ces opérations conduisent à des sérums purifiés et déspécifiés.

Les sérums antitoxiques offrent de vastes possibilités thérapeutiques, dans un but tant curatif que préventif.

Les sérums étant généralement utilisés sous forme de solutions administrées par voie parentérale, le but primitif de ce travail a été de comparer l'immunité obtenue par les diverses voies d'introduction ; essentiellement, nous avons cherché dans quelle mesure l'introduction d'un sérum antitoxique par voie veineuse - voie considérée en France comme exceptionnelle - entraînait une différence quantitative du titre d'anticorps circulants, par rapport à la voie intramusculaire considérée comme classique.

De plus, il nous a semblé intéressant de compléter cette comparaison, en étudiant de ce point de vue, une nouvelle modalité de la sérothérapie récemment apparue en France, consistant dans l'administration des antitoxines par voie rectale :

Nous avons ainsi comparé les titres d'anticorps circulants obtenus après l'administration de suppositoires, à ceux précédemment établis pour les voies parentérales.

Nos expériences ont été effectuées sur des lapins, à partir de sérums antidiphtériques d'origine ovine (sérum de Mouton) que nous pouvions nous procurer facilement.

– Lors d'une première série d'expériences, nos études ont été faites avec un sérum antidiphtérique, purifié, de Mouton.

– Puis dans un second temps, les résultats obtenus nous ont incités à refaire ces mêmes expériences en utilisant un sérum antidiphtérique, non purifié, de Mouton.

Les titres d'anticorps circulants ont été déterminés par séroneutralisation, sur des lapins, en utilisant la technique de RÖMER et SAMES (1901).

D'autre part, nous pouvions contrôler directement sur le lapin en expérience, le pouvoir neutralisant obtenu par les injections de sérum vis-à-vis d'une faible dose de toxine diphtérique diluée : c'est l'intradermoréaction de Schick, généralement utilisée sur l'Homme pour contrôler son état d'immunité.

Dans une dernière partie, notre travail fut alors consacré à rechercher si nos résultats pouvaient être expliqués par les modifications structurales subies par les anticorps, au cours des traitements mis en œuvre en vue de la purification et de la despécification des sérums.

Les données actuelles concernant la structure des immunoglobulines, nous ont enfin permis d'avancer des hypothèses explicatives.

Le plan adopté dans l'exposé de ce travail sera le suivant :

PREMIERE PARTIE

GENERALITES

1 – DEFINITIONS
2 – ORIGINE DES SERUMS ANTITOXIQUES UTILISES EN THERAPEUTIQUE
3 – SERUMS PURIFIES
4 – VOIES D'INTRODUCTION
5 – NOTIONS SUR LA STRUCTURE DES ANTICORPS

DEUXIEME PARTIE

RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS

1 – CHOIX DES VOIES D'INTRODUCTION VEINEUSE OU INTRAMUSCULAIRE
2 – INTRODUCTION PAR VOIE RECTALE

TROISIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

1 – PRINCIPE DES METHODES UTILISEES
2 – MATERIEL ET TECHNIQUES UTILISES

3 – RESULTATS DES EXPERIMENTATIONS

I – TITRAGE DES PREPARATIONS ANTITOXIQUES UTILISEES

II – EXPERIMENTATIONS - RESULTATS OBSERVES

1 - Administration de sérum antidiphtérique **purifié**, de Mouton, par les voies intramusculaire et intraveineuse.
2 - Administration de sérum antidiphtérique **non purifié**, de Mouton, par les voies intramusculaire et intraveineuse.
3 - Administration de sérum antidiphtérique de Mouton, par voie rectale.

QUATRIEME PARTIE

DISCUSSION DES RESULTATS

CONCLUSION

PREMIERE PARTIE

GENERALITES

1 – DEFINITIONS

L'immunité antibactérienne, état de protection vis-à-vis d'agents infectieux, peut être naturelle, c'est-à-dire possédée dès la naissance, ou acquise, au cours de la vie, dans différentes circonstances.

Dans le second cas, il peut s'agir :

- d'une immunité dite active, instaurée à la suite d'un contact effectif avec un micro organisme ou certains de ses produits ;

- ou d'une immunité dite passive, état de résistance temporaire induit, vis-à-vis d'un agent infectieux, par des anticorps protecteurs, transmis par des voies physiologiques (passage du sang maternel au sang du fœtus), ou administrés artificiellement (sérothérapie).

La sérothérapie fait appel à des sérums d'animaux hyperimmunisés vis-à-vis des toxines protéiques bactériennes : les antitoxines diphtérique et tétanique sont les plus largement utilisées. Elles agissent rapidement par neutralisation in vivo des toxines.

La toxine diphtérique est un produit du métabolisme de *Corynebacterium diphtheriae*. Elle est antigénique car elle suscite la formation d'une antitoxine qui réagit avec elle in vivo et in vitro.

Nous utiliserons les abréviations et unités suivantes, pour les légendes des figures et tableaux :

Ac : Anticorps
S.M.P. : Sérum antidiphtérique de Mouton, purifié
S.M.N.P. : Sérum antidiphtérique de Mouton, non purifié
I.V. : Intraveineux
I.M. : Intramusculaire
I.D. : Intradermique

D.M.M. = M.L.D. : (Dose minima mortelle ou léthale). La plus petite quantité de toxine diphtérique qui, injectée par voie sous-cutanée à un cobaye de 250 g, provoque la mort en 96 heures.

U.A. = U.A.I. : Unité internationale d'antitoxine : "Elle est représentée par l'activité neutralisante spécifique pour la toxine diphtérique contenue dans 0,0000628 g de la Préparation Etalon Internationale". (Pharmacopée Internationale, première édition, volume 1).
Pour un sérum inconnu, l'unité antitoxique se définit comme la quantité d'antitoxine qui possède le même pouvoir de combinaison qu'une unité internationale. La détermination du pouvoir neutralisant d'un sérum de titre inconnu se fait par l'intermédiaire d'une préparation étalon de toxine.

Lr/1000 : (dose réactive). La dose Lr/1000 de toxine est le plus petite quantité de toxine qui, mélangée à 1/1000 U.A. et injectée au Lapin par voie intradermique, sous le volume de 0,2 ml, contient l'excès de toxine libre juste suffisant pour provoquer, au lieu de l'injection, une légère réaction cutanée de diamètre donné (14 mm), en vingt-quatre à quarante huit heures.

2 – ORIGINE DES SERUMS ANTITOXIQUES UTILISES EN THERAPEUTIQUE

Le sérum de Cheval est habituellement utilisé pour la préparation des sérums thérapeutiques, cet animal étant apte à fournir de grandes quantités de sérum, de titre antitoxique élevé.

Les animaux sont hyperimmunisés par des injections (I.M.) d'anatoxine puis de toxine, en présence d'une substance adjuvante de l'immunité (composés aluminiques par exemple :de l'hydroxyde)d'aluminium). Les injections sont répétées 1 ou 2 fois par semaine pendant plusieurs mois.

Le sang est recueilli par ponction de la veine jugulaire, et le sérum est séparé après coagulation. Seuls sont saignés les animaux dont le sérum possède un titre d'anticorps particulièrement élevé.

Néanmoins, les risques d'accident de réinjection chez un sujet sensibilisé par une injection antérieure, ont amené les producteurs à utiliser, comme producteurs de sérum, outre le Cheval, d'autres animaux hyperimmunisés : Bovins, Ovins..., on emploie même actuellement, dans certains pays, des sérums d'origine humaine.

L'utilisation de ces sérums permet ainsi d'éviter de graves accidents survenant lors de réinjections de sérum de Cheval :

- le choc anaphylactique, parfois dramatique, qui survient brutalement

dès le début de l'injection ;

- la maladie sérique qui apparaît plus tardivement et présente des aspects cliniques très variés.

Ces accidents présentent un pronostic plus favorable, grâce aux thérapeutiques actuelles, mais néanmoins, il reste indispensable d'en éviter le risque.

3 – SERUMS PURIFIES

TISELIUS et KABAT (1939) découvrirent que les propriété antitoxiques sont portées par la fraction globulinique du sérum. Il est donc tout à fait normal d'avoir cherché à débarrasser le sérum brut des constituants différents des anticorps proprement dits.

Les premiers sérums purifiés étaient obtenus par fractionnement, au moyen de précipitations salines (relargage par les sels neutres : sulfate d'ammonium, sulfite de sodium etc...)

Ces techniques permettaient de débarrasser le sérum d'une grande partie des protéines non antitoxiques (sérum-albumine, par exemple), mais les préparations obtenues contenaient encore d'autres protéines non spécifiques du groupe des globulines normales.

La préparation d'anticorps très purifiés, par digestion enzymatique des globulines et précipitation des fractions non spécifiques par la chaleur, a été mise au point en Angleterre (POPE 1938, 1939 a et b) et appliquée ensuite dans la plupart des pays. Les globulines ainsi purifiées sont actuellement préparées industriellement. (AMOUREUX et YEU 1951).

On peut ainsi obtenir à partir de sérum de Mouton, des globulines antitoxiques (antitétanique, antidiphtérique) hautement purifiées et ayant perdu en partie leur spécificité d'espèce. Le procédé décrit par VAN TRIET (1959) est, en résumé, le suivant :

- digestion enzymatique par la pepsine en milieu acide (pH 3-4), à 27,5° C pendant 35 minutes ;

- précipitation saline (phosphate de sodium, sulfate d'ammonium) ;

- coagulation sélective des protéines non antitoxiques par la chaleur (50° C pendant 65 minutes) ;

- précipitation des globulines spécifiques par des sels neutres (phosphate de sodium ou de potassium, sulfate d'ammonium) ;

- dialyse de précipité ;

- concentration par ultrafiltration

Les anticorps sont associés aux diverses globulines : γG, γA, γM, γD, γE... Les symboles suivants ont été proposés pour les différentes classes d'immunoglobulines (Bulletin O.M.S., 1964) :

Nouvelles dénominations	Dénominations antérieures
γG ou Ig G	γ ; 7Sγ ; 6,6Sγ ; γ_2 ; γss
γA ou Ig A	β_2A ; γ_1 A
γM ou Ig M	γ_1 M ; β_2M ; 19 Sγ ; γ macro-globulines

Au début de l'hyperimmunisation, les anticorps se trouvent, chez le Cheval, souvent associés à la fraction γ globuline, tandis qu'en fin d'hyperimmunisation, on les trouve en concentration élevée dans la fraction β_2 globuline. (KECKWICK 1941 ; KECKWICK et RECORD 1941 ; RAYNAUD, RELYVELD, GIRARD et CORVAZIER 1959).

L'étude électrophorétique du sérum de Mouton, purifié (RELYVELD, VAN TRIET et RAYNAUD, 1959), a montré que les anticorps antitoxiques sont toujours associés à la même fraction sérique : ces anticorps ont une mobilité intermédiaire entre celle des β_2 et celle des γ globulines de Cheval.

La purification du sérum de Mouton hyperimmunisé permet d'éliminer les constituants non antitoxiques allergisants, de faire disparaître toute réaction croisée avec le sérum de Cheval, et de modifier l'antitoxine de telle sorte qu'elle perde, en partie, sa spécificité d'origine. Cette dernière modification a pour but d'éviter de sensibiliser des individus au sérum de Mouton.

4 – VOIES D'INTRODUCTION

L'injection de sérum antitoxique doit être faite avec des précautions rigoureuses d'asepsie : les risques d'infections viscérales, d'hépatites à virus sont particulièrement à craindre.

La voie d'introduction la plus couramment utilisée est la voie intramusculaire ; l'injection sous-cutanée, beaucoup plus lentement résorbée, est plus rarement employée.

Actuellement en France, la voie intraveineuse est une voie d'exception, considérée comme dangereuse et exposant particulièrement aux risques d'intolérance (HAMBURGER, LAPLANE, MARTIN, MARIE et SIGUIER, 1959).

Or, l'utilisation de la sérothérapie chez l'Homme présente deux aspects :

1) Elle vise à obtenir **une action préventive** chez des sujets non vaccinés ou vaccinés depuis trop longtemps. Tel est le cas de l'utilisation du

sérum antitétanique en vue de prévenir un risque de tétanos,

2) Elle vise à obtenir **une action curative** : il s'agit alors du traitement d'une maladie déclarée, à germe toxigène : diphtérie, tétanos, ou tout particulièrement d'une morsure de serpent venimeux.

Dans le premier cas, l'individu n'est pas encore en contact avec les toxines nocives, tandis que, dans le second cas, on doit chercher à neutraliser aussi rapidement que possible les toxines déjà élaborées et libérées dans l'organisme.

C'est dans cette application curative, nécessitant l'apport immédiat de doses importantes d'antitoxines que certains auteurs admettent et même recommandent l'emploi dela voie veineuse (TASMAN 1954, 1955, 1958, 1959). Cette voie d'introduction est couramment utilisée en Hollande par de nombreux médecins et adoptée par les milieux hospitaliers à Amsterdam, Utrecht, La Haye etc... (TASMAN et MINKENHOF 1959).

5 – NOTIONS SUR LA STRUCTURE DES ANTICORPS

Les anticorps sont desprotéines, plus précisément des globulines, capables de réagir spécifiquement avec l'antigène sous l'influence duquel ils ont été élaborés.

Il existe normalement, dans le sérum humain, plusieurs variétés d'immunoglobulines, migrant à l'électrophorèse avec les β et γ globulines normales :

IgG ou γG
IgA ou γA
IgM ou γM
IgD ou γD
IgE ou γE

Pour **la séparation et la purification** des anticorps, on a recours soit à des techniques **physico-chimiques,** (précipitation, électrophorèse, ultracentrifugation, chromatographie, filtration sur gels de dextrane), soit à des procédés **de dissociation d'un complexe Antigène-Anticorps** : on sépare les anticorps des autres protéines sériques en les combinant avec l'antigène homologue ; puis on dissocie ensuite le complexe formé et l'on recueille l'anticorps. (YEU et PAVAGEAU, 1956).

On a pu ainsi connaître **les propriétés particulières de chaque variété d'immunoglobulines** :

- Les γ G, sont des globulines, principalement associées à la fraction qui migre le plus lentement à l'électrophorèse ; leur constante de sédimentation est de 6,6 S ; leur poids moléculaire est voisin de 150 000.

Leur concentration dans le sang humain est environ de 60 à 70 % des globulines totales. Elles sont pratiquement toujours présentes, quels que soient l'espèce animale en cause, et l'antigène provoquant la formation d'anticorps.

- Les γ A globulines ont une mobilité électrophorétique intermédiaire entre celle des fractions γ et β du sérum ; leur constante de sédimentation est de 6,6 S*; leur poids moléculaire est voisin de 150 000 ; leur concentration dans le sang humain atteint 15 à 20 %. Elles représentent la majeure partie des anticorps antitoxiques chez le Cheval, apparaissent après les γ G globulines, mais forment la plus grande partie des anticorps en fin d'immunisation.

- Les γ M globulines migrent aussi entre les γ et β globulines ; leur constante de sédimentation est de 18 S*; leur poids moléculaire est voisin de 900 000 ; leur concentration dans le sang humain est normalement faible (5 à 10 %), mais devient très élevée dans certains processus pathologiques. Leur structure polymére a été mise en évidence par l'action d'agents réducteurs qui provoquent une dépolymérisation, d'ailleurs réversible.

- Les γ D globulines migrent entre les γ et β globulines ; leur constante de sédimentation est de 7 S; leur concentration sanguine est environ de 1 %.

- Les γ E globulines ont une constante de sédimentation de 7 S.

Les γ D et γ E sont des classes de globulines récemment découvertes, leurs fonctions ne sont pas nettement définies ; les réagines seraient associées aux γ E globulines.

Une publication très récente (Bull. Org. Mond. Santé, 1968) décrit l'immunoglobuline γ E. Cette globuline a été identifiée dans le sérum humain normal, et également dans le sérum d'un malade atteint de myélome multiple. Son poids moléculaire est de l'ordre de 200 000.

On a cherché à localiser, sur les molécules d'anticorps, les motifs chimiques responsables de leurs propriétés biochimiques et immunologiques. Cette étude structurale a été possible, grâce à différentes méthodes de fragmentation des molécules en sous-unités analysables, principalement sur des γ globulines de Lapin et des γ globulines humaines, mais aussi avec des immunoglobulines d'autres espèces animales :

Les globulines sont formées de chaînes polypeptidiques, liées entre elles par des ponts disulfure. La fragmentation de ces chaînes a été obtenue par différentes techniques, utilisant soit l'action d'enzymes tels que la papaïne ou la pepsine, soit l'action de réducteurs.

● Les méthodes de **fragmentation enzymatique** des γ globulines ont donné les résultats suivants :

---

* Une partie de ces globulines est polymérisée ; constantes de sédimentation : 9, 11, 13, 15, 17 S, pour les γ A, et 25, 35 S pour les γ M.

1) PORTER (1959, 1960, 1963), au moyen de **papaïne** activée par la **cystéine**, obtient, en un seul temps, 3 fragments séparés par chromatographie :

Les fragments I et II, ultérieurement dénommés *Fab*, (" fragment antigen binding "), ont un poids moléculaire de 52 000 chacun ; ils se combinent avec l'antigène homologue mais ne possèdent pas la propriété de précipiter avec lui ; chacun est univalent.

Le fragment III, ultérieurement dénommé *Fc*, (" fragment crystalline "), est cristallisable, son poids moléculaire est de 48 000 ; il est dénué d'activité anticorps et est commun aux diverses γ globulines de sérum.

2) En deux temps, NISONOFF, WISSLER, LIPMAN et WOERNLY (1960), NISONOFF et RIVERS (1961), ont également obtenu une scission de la molécule en fragments univalents ; cette réaction est en partie réversible, et permet alors de reconstituer des molécules porteuses d'une double spécificité antigénique.

Cette fragmentation est obtenue par l'action de la **pepsine**, qui détruit le fragment III, *Fc*, et laisse un fragment *(Fab')2*, de poids moléculaire de 100 000, qui conserve l'activité précipitante.

Dans un deuxième temps, la **cystéine** divise ce fragment en deux parties identiques aux fragments *Fab* .

● Les méthodes de fragmentation par **l'action de réducteurs, avec ou sans agent dénaturant** ont donné les résultats suivants :

EDELMAN et POULNIK (1961), ont effectué une **réduction par le mercaptoéthanol** en présence **d'urée** agissant comme agent dénaturant.

Cette réduction conduit à des sous-unités des molécules d'anticorps, de poids moléculaires plus faibles. Ces sous-unités ont perdu leurs propriétés immunologiques et leur solubilité dans l'eau.

Leur étude par électrophorèse et par chromatographie fait apparaître que les molécules de γ globulines sont formées de deux catégories de chaînes polypeptidiques :

- **des chaînes lourdes** A (PM : 55 000)
- **des chaînes légères** B (PM : 22 000)

En l'absence d'agent dénaturant, FLEISHMAN, PAIN et PORTER (1962) ont obtenu des éléments semblables, mais conservant leurs propriétés immunologiques.

Les chaines A ont des déterminants antigéniques spécifiques de chaque variété immunologique.

Les chaines B sont antigéniquement communes aux trois immunoglobulines.

Ainsi, les immunoglobulines γG, γA, γD, γE sont constituées de l'association de : **deux chaînes polypeptidiques lourdes** A, respectivement dénommées γ, α, δ, ϵ, et de **deux chaînes polypeptidiques légères** B, soit de type I, soit de type II, respectivement dénommées χ et λ.

Les immunoglobulines γM sont constituées d'une association de plusieurs chaînes lourdes (μ) et légères, en un nombre multiple de celui présent dans les autres globulines.

Chaque molécule d'immunoglobuline présente l'un ou l'autre de ces deux types, I (χ) ou II (λ). (figure n° 1).

- les chaînes lourdes (γ, α, δ, ϵ, μ), sont, sur le plan antigénique, caractéristiques des classes G, A, D, E, M, des immunoglobulines.

- les chaînes légères des classes d'immunoglobulines sont identiques et présentent l'une ou l'autre des deux spécificités antigéniques déterminant le type χ ou λ de l'immunoglobuline considérée. Il existe, de plus, des différences entre les chaînes analogues, provenant d'individus différents ; ce sont des facteurs d'ordre génétique portant la dénomination d'allotypes.

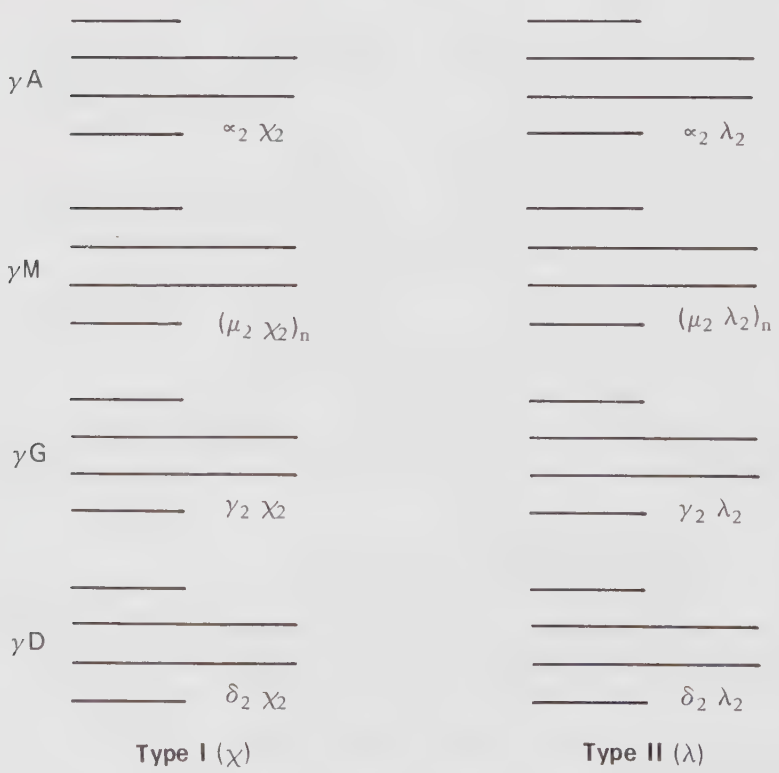


Figure n° 1

Les chaînes lourdes et légères sont réunies par des ponts disulfure. C'est au niveau de ces ponts qu'agissent la papaïne et la pepsine, et on a pu établir une relation entre les fragments Fab, Fc, et les chaînes A et B, par l'étude comparée de leurs caractères antigéniques.

L'action de la papaïne se ferait suivant le schéma suivant : (figure nº 2)

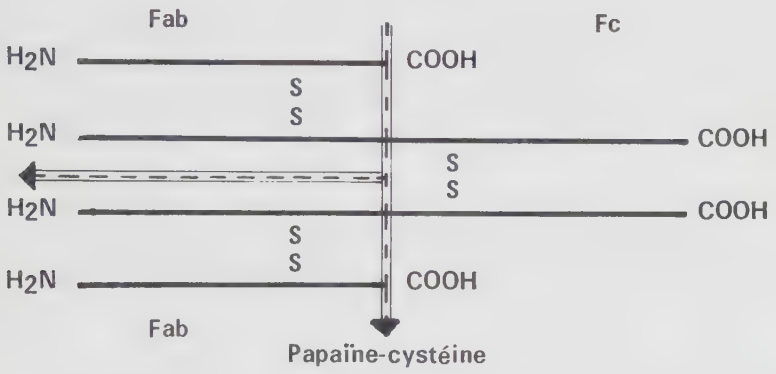


Figure nº 2

et l'on obtient deux fragments Fab (I et II) monovalents et un fragment Fc cristallisable ; alors que la pepsine scinderait la molécule globulinique en laissant unis les deux fragments Fab pour donner un fragment (Fab') 2, bivalent, suivant le schéma suivant (figure nº 3).

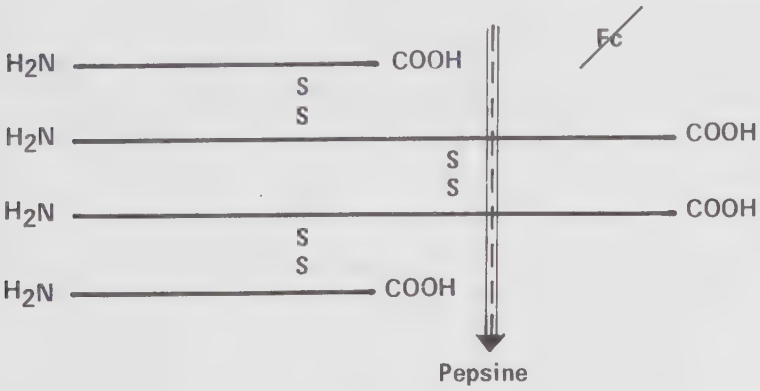


Figure nº 3

Des études plus récentes, particulièrement grâce à **l'examen au microscope électronique de complexes antigène-anticorps,** permettent d'établir la correspondance plus précise entre les groupements chimiques et les propriétés biologiques.

Le **Site Anticorps,** c'est-à-dire la partie superficielle de la molécule douée d'une configuration complémentaire de celle de l'antigène et qui lui permet de se fixer à celui-ci, représenterait 1 à 2 % de la surface moléculaire totale. On sait que le traitement des globulines par la pepsine ou la papaïne, permet d'éliminer 30 à 40 % de la molécule anticorps sans lui enlever la possibilité de se fixer à l'antigène. Chaque fragment Fab porte un site réactif anticorps. Toute la molécule d'anticorps γ- globuline donne ainsi deux fragments monovalents ; elle est donc bivalente et considérée comme portant deux sites anticorps identiques à ses extrêmités.

Les données actuelles conduisent à admettre que le site anticorps résulte de la coopération d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère, ce qui permet de représenter la molécule suivant le schéma suivant : (figure nº 4).

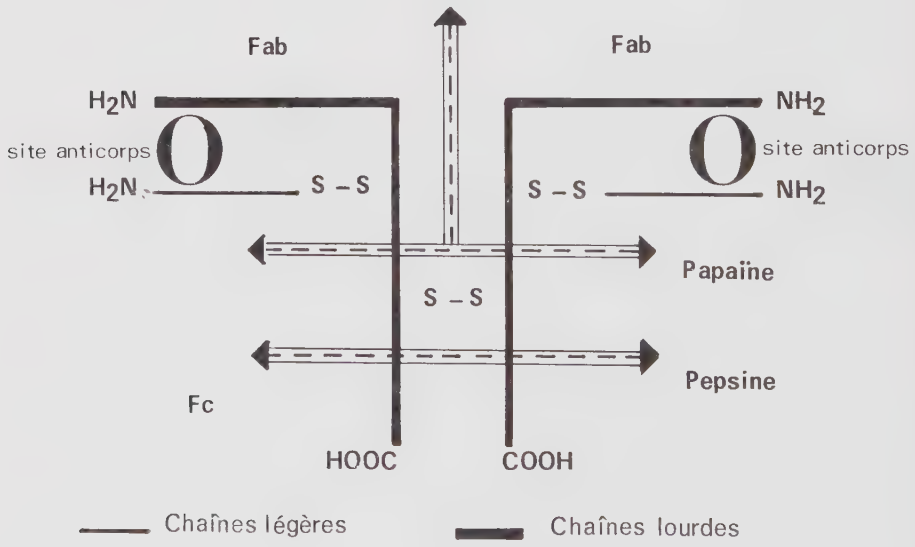


Figure nº 4

Il y aurait donc un repliement des chaînes lourdes, qui permet aux sites anticorps d'occuper les deux extrémités de la molécule.

On a observé pour les γG globulines deux sites anticorps ; pour les γM, on en a dénombré cinq ; les γM seraient l'assemblage de 5 éléments analogues aux γG, mais ne présenteraient que la moitié des sites anticorps présents sur une quantité égale de γG.

En conclusion, les sites anticorps des globulines sont portés par l'extrémité des molécules, les anticorps possèdent généralement deux sites combinants de spécificité identique. La conservation de cette spécificité semble être conditionnée par la présence de certains ponts disulfure.

Outre les sites anticorps, les immunoglobulines portent d'autres sites spécifiques :

- **Sites antigéniques** : les sites antigéniques de spécificité isotypique, communs à tous les individus d'une même espèce. Les sites de spécificité allotypique spécifiques d'un même individu, sont portés par les chaines lourdes et légères.

- **Sites de fixation du complément** : portés par le fragment Fc des globulines.

- **Sites de fixation sur les tissus** : ils sont portés par le fragment Fc des γG. Ce fragment peut être détruit par la pepsine, et l'immunoglobuline se trouve privée de cette propriété.

- **Site permettant le passage de la barrière placentaire** : il serait également porté par le fragment Fc des γG (seules les γG passent à travers la membrane placentaire).

Ces notions générales sur la structure des globulines, et tout particulièrement sur l'emplacement des sites anticorps, nous seront indispensables pour envisager l'explication des différents titres d'anticorps sériques obtenus chez le Lapin, suivant les voies d'introduction utilisées

DEUXIEME PARTIE

RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS

1 – CHOIX DE LA VOIE VEINEUSE OU INTRAMUSCULAIRE POUR L'APPLICATION DE LA SEROTHERAPIE ANTIDIPHTERIQUE

[TASMAN, MINKENHOFF, BRANDWIJK et SMITH (1958)]

Une étude approfondie a été réalisée par TASMAN et ses collaborateurs en 1958 qui décrivent "**l'importance de l'injection intraveineuse du sérum antidiphtérique**". Nous nous proposons de résumer ici les travaux effectués par ces auteurs car ce sont eux qui ont fourni la base de départ de nos propres travaux.

En 1954 - 1955, TASMAN a démontré la présence de la toxine diphtérique dans la salive des malades diphtériques. De plus, il a observé que l'injection intramusculaire de sérum antidiphtérique neutralise plus ou moins rapidement cette toxine, l'antitoxine élaborée étant excrétée par les glandes salivaires.

1) TASMAN étudia comparativement cette **excrétion salivaire d'antitoxine** après introduction intramusculaire ou intraveineuse de doses égales de sérum antidiphtérique purifié (10000 à 20000 unités antitoxiques internationales).

Les résultats obtenus montrent que :

30 minutes après l'injection intraveineuse, la salive des malades en expérience contient déjà l'antitoxine ;

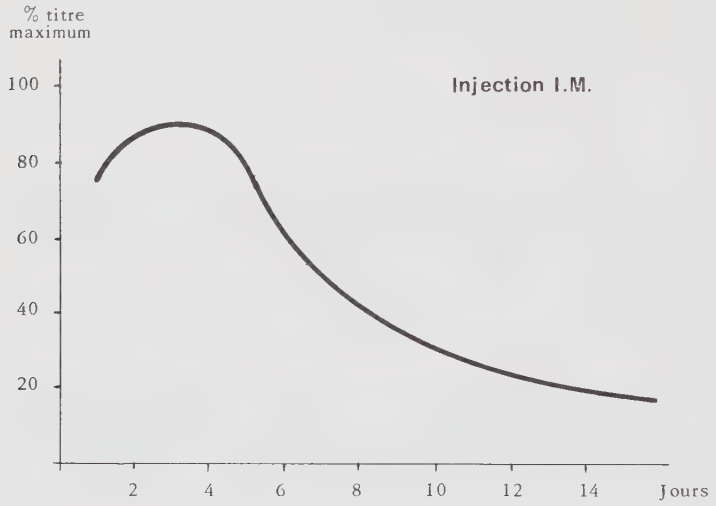
30 minutes après l'injection intramusculaire, la présence d'antitoxine dans la salive est exceptionnelle et n'atteint son maximum qu'après 10 à 24 heures.

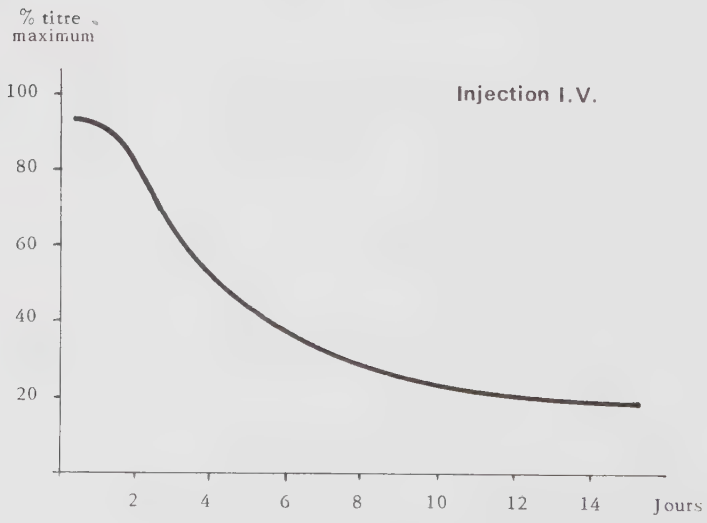
2) TASMAN poursuivit cette étude comparative des deux voies d'introduction, intramusculaire et intraveineuse, en titrant par séroneutralisation les antitoxines dans le sérum, à des temps variables après l'injection.

Ces expériences ont été effectuées sur des malades ; les prises de sang ont été faites avant et après les injections intramusculaires et intraveineuses ; le titre

d'antitoxine sérique a été déterminé avant et : 1 - 2 - 4 - 6 - 8 - 10 - 12 - 14 - 16 - 18 - 20 et 22 jours après.

Les résultats obtenus furent transcrits sur des courbes que nous reproduisons ci-après :





Figures nº 5 et 6

Titres sériques moyens, après injection de sérums, exprimés en pourcentage du titre maximum trouvé

On peut observer que le titre sérique est maximum 2 à 4 jours après l'injection intramusculaire, alors qu'il est d'emblée maximum après injection intraveineuse. D'autre part, les titres d'antitoxine deviennent similaires, selon les cas, du 4ème au 6ème jour, et à partir de ce moment, les deux courbes sont pratiquement superposables. Après ce temps, l'évolution de la courbe indique que les antitoxines introduites par voie veineuse ne sont pas excrétées beaucoup plus rapidement que par voie intramusculaire.

" Au regard de quoi, il n'y a aucune raison de préférer l'injection intramusculaire à l'injection intraveineuse. " Telle fut la conclusion de l'auteur à cette série d'expériences.

3) Abandonnant le matériel humain, TASMAN continua ses expériences sur des cobayes en définissant un " animal-modèle ". Utilisant des quantités déterminées de toxine et d'antitoxine, et un intervalle défini entre les injections, il obtint un tableau clinique dont les différents points purent être étudiés séparément.

Si l'on injecte à un tel animal des quantités fixes de toxine et d'antitoxine, l'intervalle de temps entre l'injection de la première et de la seconde est déterminant :

- un intervalle court s'accompagne de symptômes légers ou peu durables ; parfois même, aucun signe n'est observé.

- un intervalle plus long, permet d'observer des symptômes graves : perte de poids, manifestations cardiaques, paralysies, mort.

Un choix approprié des trois facteurs déterminants : la quantité de toxine, la quantité d'antitoxine, et l'intervalle de temps entre les injections, permet de déterminer l'influence d'un quatrième facteur : la voie d'introduction de l'antitoxine.

Les différents symptômes cliniques étudiés dans ce but, ont été les suivants :

- **Etude de l'évolution pondérale**

TASMAN a pu établir une courbe des poids moyens en fonction du temps.

Trente animaux reçurent cinq doses minima mortelles de toxine diphtérique. Neuf heures après, quinze reçurent par voie intramusculaire, et les quinze autres par voie veineuse, une unité antitoxique internationale de sérum. Tous les animaux ont été pesés deux fois par jour. On observa alors une **perte de poids plus forte et plus prolongée chez les animaux injectés par voie intramusculaire**.

- **Etude de la paralysie**

L'étude a été faite en diminuant l'intervalle de temps entre les

injections de toxine et d'antitoxine : 6 heures 30 au lieu de 9 heures.

La manifestation de syndromes paralytiques apparut plus ou moins rapidement suivant que l'injection fut intramusculaire ou intraveineuse.

Au bout de 33 jours, on a pu noter :

- **100 % de paralysies après introduction par voie intramusculaire**
- **30 % de paralysies après introduction par voie intraveineuse**

- **Etude des manifestations cardiaques**

L'étude des lésions observées sur des coupes de cœur prélevé sur des animaux a montré une nette différence entre les résultats des deux voies d'introduction, en faveur de la voie veineuse.

La toxine circulante est plus rapidement neutralisée et agit moins longtemps au niveau du myocarde.

Ces expériences ont amené les auteurs à préférer la voie veineuse pour l'introduction de l'antitoxine. Les arguments avancés en faveur de cette voie d'administration ont été les suivants :

- le titre d'emblée maximum d'anticorps circulants.

- le fait que l'antitoxine, en tant que protéïne non spécifique, n'est pas dénaturée ni excrétée plus rapidement.

- la neutralisation plus rapide de la toxine dans la salive laissant prévoir l'action plus rapide au niveau de la gorge et du pharynx.

- la diminution des risques de lésions cardiaques, et l'atténuation probable de leur gravité.

- la diminution des risques de paralysie.

- la diminution de la mortalité.

L'introduction de la toxine diphtérique par voie veineuse est toujours appliquée en Hollande dans les cas de diphtérie déclarée (Hôpitaux d'Amsterdam, La Haye, Utrecht,- TASMAN, 1959).

A la même époque, des auteurs français, HAMBURGER, LAPLANE, MARTIN, MARIE, SIGUIER (1959), au cours d'une confrontation thérapeutique à l'Hôpital Necker, déconseillent vivement cette voie d'administration ; d'après ces auteurs, " on s'expose à des chocs anaphylactiques graves, pour un bénéfice minime... L'injection de sérum par voie intraveineuse apporte, certes, instantanément dans le sérum des anticorps mais les quelques heures que l'on gagne ainsi ne sauraient contrebalancer les dangers que l'on fait courir au patient ".

A la suite de cette condamnation de la voie veineuse, TASMAN (1959), répondit à ces auteurs, et fort des expériences effectuées en 1958, affirma de nouveau les avantages de l'administration par voie veineuse.

Il maintint, d'autre part, que si l'injection veineuse est faite avec précaution, c'est-à-dire après un test de sensibilité préalable négatif (0,2 ml de sérum dilué au 1/10, injecté par voie intradermique sur la face interne de l'avant bras), il n'a jamais été observé de réaction nocive, chez plusieurs centaines de malades ; au plus, certains malades ont-ils parfois présenté un frisson de courte durée.

L'Institut National de la Santé Publique à Utrecht, dans la notice d'emploi des ampoules de 10 000 U.A. de sérum antitoxique, conseille la voie veineuse dans tous les cas, et non pas seulement dans les cas graves. Pour faciliter le contrôle de sensibilité, chaque ampoule de sérum antidiphtérique est accompagné d'une ampoule de sérum dilué.

En conclusion, TASMAN et ses collaborateurs, ont indiqué que :

« *La voie d'introduction veineuse de l'antitoxine diphtérique doit être préférée dans tous les cas et non pas seulement réservée aux cas sérieux de diphtérie déclarée.* Cette voie est même conseillée pour tous les sujets chez lesquels la diphtérie n'est que suspectée».

2 – TRAVAUX EFFECTUES SUR L'INTRODUCTION DE GLOBULINES DIVERSES PAR VOIE RECTALE

Afin d'étudier l'administration par voie rectale d'antitoxines sous forme de suppositoires, il était indispensable de connaître les travaux effectués jusqu'à présent à l'aide de globulines diverses.

Des travaux récents, sur ce sujet, ont fait l'objet d'une publication d'ARDRY et COURTIN (1961), qui montrèrent que les globulines de Cheval passent facilement dans la circulation sanguine du Lapin, si elles sont administrées à cet animal sous forme de suppositoires.

Les premiers essais d'administration d'anatoxine tétanique, par sonde rectale, avaient été déjà effectués antérieurement par E. LE METAYER (1935) : la présence d'anticorps dans le sérum des lapins s'est montrée nulle lorsque la sonde pénétrait très profondément alors qu'une légère immunité était obtenue si l'injection était faite dans la partie terminale du tube digestif. De ce fait les auteurs conclurent à la possibilité d'une facile absorption des anticorps si ceux-ci étaient administrés sous forme de suppositoires.

La pénétration des antitoxines à travers la muqueuse rectale a été étudiée, au moyen de γ globulines de Cheval, marquées à l'iode 131, (γ globulines antitissulaires, anticerveau, anticartilage) - (ARDRY et COURTIN 1961).

Ces auteurs observèrent une pénétration des protéines débutant entre la 1ère et la 2ème heure et atteignant son maximum à la 6ème heure. La proportion moyenne de pénétration serait, chez le Lapin, de 6 % des protéines administrées.

L'administration thérapeutique de globulines par voie rectale fut enfin proposée par H. MAMOU (1962) qui observa de bons résultats dans l'emploi, sous forme de suppositoires, d'une globuline antihistaminique (G.A.H.) pour le traitement des syndromes prémenstruels. L'absorption a été étudiée à l'aide de globuline antihistaminique marquée.

D'autres travaux semblables ont été conduits avec des β et γ globulines antitissulaires, spécifiques du cartilage et des parathyroides, dans des essais de traitement d'arthroses et des décalcifications osseuses (H. MAMOU, 1963).

TROISIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

1 – PRINCIPE DES METHODES UTILISEES

Nous avons voulu vérifier dans quelle mesure l'introduction par voie intramusculaire ou par voie veineuse, d'un sérum antitoxique entraîne une production du titre d'anticorps dans le sang circulant, différente suivant la voie utilisée.

Pour cette étude, nous avons choisi le sérum antidiphtérique. La toxine diphtérique possède, en effet, en plus de son activité léthale, un pouvoir dermo-nécrotique puissant qui peut être neutralisé par une quantité appropriée de sérum antitoxique.

Cette propriété nous offre deux possibilités d'évaluation de l'état d'immunité passive que nous apportons à l'animal en expérience :

A) **Un titrage** simple et précis de sa concentration en **anticorps circulants**. Ce titrage s'effectue sur des échantillons de sérum, prélevés sur l'animal à des temps variables après l'administration d'antitoxines

B) **Un contrôle direct de l'apparition de l'état d'immunité** chez l'animal : c'est l'application de l'intradermo-réaction de **Schick,** habituellement utilisée chez l'Homme.

La réaction de Schick ne rend compte que d'un état d'immunité tandis que le dosage de l'antitoxine diphtérique dans le sérum des animaux précise la valeur de cette immunité induite par administration de sérum.

A – TITRAGE DES ANTICORPS CIRCULANTS

"L'activité d'un échantillon de sérum antidiphtérique est déterminée en comparant la dose nécessaire pour protéger le Cobaye, ou tout autre animal convenable, contre l'action d'une dose donnée de toxine diphtérique, avec la dose d'une préparation étalon de sérum antidiphtérique nécessaire pour obtenir la même protection". (Pharmacopée Internationale. Vol. 1).

Pour cette comparaison, sont nécessaires :
- La préparation étalon internationale de sérum antidiphtérique,

- Une toxine diphtérique utilisée comme toxine d'épreuve. Son activité est d'abord déterminée vis-à-vis de la préparation étalon de sérum, par la méthode choisie.

L'activité de l'échantillon de sérum à essayer est déterminée, par rapport à l'activité de la toxine d'épreuve, par la même méthode.

Différentes méthodes de titrages s'offrent à nous suivant la technique utilisée pour déterminer l'activité de la toxine d'épreuve, par rapport à la préparation étalon internationale :

(1) **Choix de la toxine utilisée comme toxine d'épreuve.**

Pour choisir une toxine comme toxine d'épreuve, on détermine les quantités suivantes de l'échantillon * :

a) **La dose L+** :

" Elle représente la plus petite quantité de toxine qui, mélangée avec 1 Unité Internationale Antitoxique et injectée sous la peau de cobayes pesant 250 à 270 g chacun, provoque la mort en quatre jours, les animaux présentant les symptômes de la toxémie diphtérique non compliquée ".

b) **La dose Lo** :

" Elle représente la plus grande quantité de toxine qui, mélangée avec 1 Unité Internationale Antitoxique, et injectée sous la peau de cobayes pesant chacun 250 à 270 g, ne produit aucune réaction locale ou générale ".

c) **La dose Lr/100** :

" Elle représente la plus petite quantité de toxine qui, mélangée à 0,01 Unité Internationale Antitoxique et injectée par voie intradermique à des cobayes, provoque, en vingt-quatre à quarante-huit heures, une petite réaction caractéristique au lieu de l'injection ".

Nous avons utilisé pour le présent travail cette dernière technique de détermination :

Cette méthode de titrage, par voie intradermique, est inscrite à la Pharmacopée Internationale (Editio Prima-Volumen 1) (Bulletin de l'Organisation Mondiale de la santé - supplément 2 - 1951) et a été décrite précédemment par ROMER et SAMES (1909), et FRASER et WIGHAM (1924).

Nous en donnerons, ci-dessous, le principe, et la décrirons de façon détaillée au paragraphe suivant.

---

*Les définitions suivantes sont celles de la Pharmacopée Internationale.

(2) **Détermination de la dose d'épreuve - Principe de titrage**

a) **Détermination de la dose Lr/100 de toxine par injection intradermique au Cobaye ou au Lapin.**
(Il est précisé que le Lapin peut être utilisé à la place du Cobaye pour les essais par voie intradermique - Pharmacopée Internationale).

Le sérum étalon international est utilisé après une dilution telle que 1 ml contienne 0,1 unité antitoxique internationale.

Sous un volume constant de 2 ml, on prépare des mélanges contenant : une dose fixe (0,1 U.A.I.) de sérum étalon international et une quantité variable de toxine d'épreuve.

Les mélanges, après avoir été laissés 1 heure à la température du laboratoire, sont injectés par voie intradermique dans les flancs rasés de cobayes ou de lapins, sous un volume de 0,2 ml et à des intervalles convenablement espacés.

La lecture a lieu 48 h après les injections.

"La dose d'épreuve Lr/100 de toxine est la quantité présente dans 0,2 ml de ce mélange qui provoque, au lieu de l'injection, une petite réaction caractéristique de la peau du cobaye. Les mélanges contenant de plus grandes quantités de toxine provoquent une réaction plus importante et de la nécrose ; et les mélanges contenant de plus petites quantités de toxine, ne provoquent pas de réaction". (Pharmacopée Internationale).

b) **Détermination de l'activité d'un échantillon de sérum antidiphtérique, par injection intradermique au Cobaye ou au Lapin.**

La toxine d'épreuve est diluée de sorte que 1 ml contienne 10 fois la dose d'épreuve Lr/100.

Les mélanges, sous un volume de 2 ml, contiennent une quantité fixe de toxine diluée (1 ml), et des quantités variables de sérum à essayer.

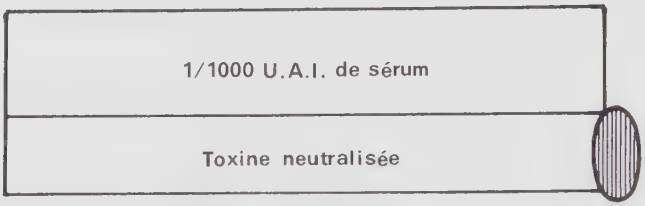
On prépare de même, sous un volume de 2 ml, un mélange contenant 1 ml de la même dilution de toxine et 1 ml de sérum étalon international, soit 0,1 unité antitoxique internationale.

Les mélanges sont injectés dans les conditions décrites pour la détermination de la dose d'épreuve Lr/100 de la toxine.

"Le mélange de sérum antitoxique à essayer qui contient 0,01 Unité Internationale dans 0,2 ml est le mélange qui provoque le même degré de réaction locale que celui produit par l'injection au même animal d'un mélange qui contient, dans 0,2 ml, la dose d'épreuve Lr/100 de la toxine, et 0,01 Unité Internationale Antitoxique". (Pharmacopée internationale).

En utilisant la technique Lr/100, la dose limite d'antitoxine décelable est de 0,1 unité antitoxique internationale par millilitre de sérum.

Dans le travail présent, les titrages ont été effectués au niveau Lr/1000, permettant de déterminer jusqu'à 0,01 unité antitoxique internationale par millilitre de sérum.



Quantité de toxine libre donnant une réaction cutanée de environ 13 mm chez le Lapin, après 48 h.

Figure nº 7
Rappel schématique du principe de titrage

B – CONTROLE DIRECT DE L'IMMUNITE ACQUISE PASSIVEMENT - APPLICATION DE L'INTRADERMO-REACTION DE SCHICK.

La réaction de Schick est une " intradermo-réaction spécifique, épreuve clinique permettant de déceler chez l'Homme son état d'immunité vis-à-vis de la toxiinfection diphtérique ". (Codex Edition VIII 1965 p. 1232).

La toxine diphtérique diluée, uniquement utilisée pour l'intradermo-réaction de Schick, est inscrite au Codex et définie de la sorte : " Dilution de toxine diphtérique, stabilisée dans une solution tampon boratée stérile, telle que 0,1 ml de cette dilution corresponde au 1/50 de la dose minimale mortelle en quatre jours pour le Cobaye de 250 g ".

Cette épreuve peut être appliquée au Lapin et l'activité dermonécrotique de la toxine diphtérique diluée est évaluée de la façon suivante :

- 1 dose de toxine de Schick (0,1 ml), injectée par voie intradermique dans la peau rasée d'un lapin, provoque, après 48 heures, l'apparition d'une réaction érythémateuse caractéristique, d'un diamètre supérieur à 20 mm, avec nécrose.

- diluée au 1/10, la toxine provoque dans les mêmes conditions, une réaction érythémateuse de 17 mm environ de diamètre.

- diluée au 1/100, elle ne donne aucun érythème.

Figure nº 8

Rappel schématique de l'évaluation de l'activité dermonécrotique de la toxine de Schick

- 1 dose de toxine diphtérique diluée pour réaction de Schick
- = érythème d'un diamètre > 20 mm avec nécrose
- 1/10de cette même dose
  = érythème d'un diamètre # 17 mm
- 1/100 de cette même dose
  = réaction négative, ou traces.

Chez l'Homme, l'immunité se traduit " après une injection de 0,1 ml de toxine diluée pour réaction de Schick, par l'absence de toute réaction locale, témoignant par millilitre de sang d'au moins 1/30 d'Unité Antitoxique diphtérique, taux reconnu comme seuil de l'immunité spécifique ". Codex p. 1232 - 1965. Edition VIII.

Appliquée au Lapin, la réaction de Schick nous offre un contrôle de l'apparition et de la persistance dans la circulation des antitoxines qui lui sont administrées par des voies diverses :

- Si nous l'effectuons avant et à des intervalles de temps réguliers après l'administration de sérum antidiphtérique, sur la peau de l'animal en expérience, nous la voyons d'abord fortement positive, puis devenir progressivement négative à mesure que s'installe l'immunité. Elle sera négative lorsque le titre sérique d'anticorps sera suffisamment élevé. Elle redeviendra positive lorsque les anticorps seront éliminés de la circulation.

Nous avons, au cours de cette étude, utilisé ce contrôle direct sur l'animal que l'on cherchait à immuniser, parallèlement à chaque titrage d'un échantillon de son sérum :

- L'intradermo-réaction de Schick nous a donné un moyen de déceler l'immunité passive produite chez l'animal.

- Le titrage de son sérum effectué par voie intradermique dans la peau d'un animal neuf, suivant la méthode exposée plus haut, nous a permis une évaluation précise de la proportion d'anticorps présents dans chaque échantillon de sang prélevé.

a) Nous avons entrepris nos premières séries d'expériences avec du sérum antidiphtérique, purifié, de Mouton.

Ce sérum a été introduit chez les lapins par voies intramusculaire, intraveineuse ou rectale.

- L'état d'immunité a été décelé par des réactions de Schick effectuées à des temps variables avant et après l'introduction de sérum, sur la peau des lapins en expérience.

- Parallèlement, aux mêmes temps, le sang des lapins a été prélevé et son titrage a été effectué sur des lapins neufs, par la technique de RÖMER et SAMES.

- Les différents titres obtenus, suivant les voies d'introduction employées, ont été notés et comparés.

b) Puis, dans un second temps, les résultats obtenus nous ont incitée à renouveler ces expériences avec un sérum antidiphtérique de Mouton, non purifié.

Sur le Lapin neuf, la réaction de Schick n'est jamais spontanément négative. Il est donc inutile d'effectuer un témoin de l'épreuve de Schick à chaque série d'expériences.

2 – MATERIEL ET TECHNIQUES UTILISES

Nous étudierons successivement :

A - Les réactifs utilisés
B - La fabrication des suppositoires
C - Le matériel nécessaire
D - La méthode de titrage
E - La technique de l'intradermo-réaction de Schick.

A – REACTIFS UTILISES

1 – SERUM ETALON INTERNATIONAL ANTIDIPHTERIQUE
(Statens Serum Institute - Copenhague Danemark)

La préparation étalon internationale est constituée par une certaine quantité de sérum antidiphtérique desséché.

" L'Unité Internationale est représentée par l'activité neutralisante spécifique pour la toxine diphtérique contenue dans 0,0000628 g de la préparation étalon internationale ".

Le sérum étalon est délivré en solution contenant 2/3 de son volume de glycérol ; il titre 10 unités antitoxiques internationales par millilitre.

Les dilutions ultérieures, ainsi que toutes les dilutions des réactifs nécessaires aux titrages, sont faites à l'aide d'une solution stérile d'eau peptonée dont la composition est la suivante :

NaCl	9 g
Peptone pepsique de viande.	10 g
Eau distillée . . . . . qsp	1000 ml

Cette solution est ajustée à pH 7, 4 et stérilisée 30 minutes à 120° C.

2 – TOXINE DIPHTERIQUE

La toxine diphtérique est un filtrat stérile d'un milieu de culture liquide, à base d'hydrolysat de caséine, dans lequel s'est développée une souche toxigène de *"Corynebacterium diphtheriæ"*. La préparation de cette toxine a été décrite par divers auteurs : MUELLER et MILLER (1941), HOLT (1948), RELYVELD et ses collaborateurs (1954), RELYVELD (1959).
La toxine est stabilisée par vieillissement en glacière, pendant plusieurs mois, et est conservée à une température de 0° C à 5° C.

Nous utiliserons au cours de notre travail, une solution de toxine diphtérique à 1 pour 1500, préparée à l'aide d'eau peptonée stérile. (Cette dilution a été déterminée par titrage au niveau Lr/1000, par rapport au sérum international Voir p. 27).

3 – SERUM ANTIDIPHTERIQUE PURIFIE, DE MOUTON

Le sérum antidiphtérique que nous avons utilisé pour étudier les différentes voies d'introduction chez l'animal est un sérum purifié, de préparation commerciale, d'origine hollandaise ("Rijks Instituut Voor Volksgezondheid ", Utrecht).

Les contenus de plusieurs flacons destinés à un usage thérapeutique ont été réunis aseptiquement, et ce mélange a été titré comme nous l'indiquerons plus loin, après avoir été **dilué au cinquantième** à l'aide d'eau peptonée stérile. Nous avons conservé cette solution en glacière.

4 – SERUM ANTIDIPHTERIQUE NON PURIFIE, DE MOUTON

Il s'agit d'un sérum, préparé par injections répétées au Mouton, d'anatoxine diphtérique adsorbée sur hydroxyde d'aluminium.

Après avoir déterminé son titre, nous l'avons dilué dans des proportions convenables afin de l'utiliser dans les mêmes conditions que le sérum purifié.

5 – TOXINE DIPHTERIQUE DILUEE, POUR INTRADERMO-REACTION DE SCHICK

Il s'agit de la préparation utilisée aux Etats-Unis et gracieusement mise à notre disposition par le "National Institute of Health" à Bethesda.

Le contenu lyophilisé de chaque ampoule est reconstitué sous un volume de 1 ml à l'aide d'eau distillée stérile ; une ampoule contient 1090 doses de toxine diluée pour réaction de Schick.

Les dilutions ultérieures ont été faites dans du soluté physiologique de chlorure de sodium, tamponné à pH 7, 4 et additionné de 0,2 pour 100 de gélatine. A cet effet, on prépare un tampon phosphaté M/15, selon SORENSEN :

Solution de phosphate disodique, 12 H_2O à 23,866 g/l, additionnée de 1 pour 10.000 de merthiolate de sodium	800 ml
Solution de phosphate monopotassique à 9,078 g/l, additionnée de 1 pour 10.000 de merthiolate de sodium	200 ml
Chlorure de sodium	9 g pour 1000
Gélatine	2 g pour 1000

Après stérilisation à 120° C, pendant 30 minutes, on complète le volume de liquide évaporé à 1 litre, avec de l'eau distillée stérile.

- une ampoule de toxine reconstituée, est diluée dans 109 ml de solution tampon stérile, donnant :

1 dose pour réaction de Schick dans 0,1 ml.

B – **FABRICATION DES SUPPOSITOIRES**

Des lots de suppositoires ont été préparés, à des titres variables en antitoxine, à partir des sérums purifiés et non purifiés.

L'excipient utilisé est le "Suppocire Gattefossé AM, ou AMX" ; un millilitre de sérum antidiphtérique est incorporé à 14,2 g d'excipient. A partir

de cette masse, on peut préparer environ 75 suppositoires ; chaque suppositoire pèse environ 0,20 g.

La préparation des suppositoires est faite de la façon suivante : La cire est chauffée au bain-marie à 45°C ; le sérum y est alors mélangé à l'aide d'un homogénéiseur ; le mélange homogène, toujours à cette température, est prélevé à la pipette Pasteur, et versé dans des moules en matière plastique ; ceux-ci, une fois remplis, sont placés dans de l'eau à température ordinaire.

La conservation se fait à la température ambiante ; on peut placer les suppositoires en glacière, une heure avant l'utilisation.

C – **MATERIEL UTILISE**

1 – ANIMAUX ET INJECTIONS

Nous avons employé pour tous nos titrages des lapins albinos, mâles ou femelles, pesant environ 2,500 Kg.

Les animaux ont été rasés à l'aide d'une tondeuse électrique. La région rasée est nettoyée à l'alcool.

On dessine, de part et d'autre de l'épine dorsale, à l'aide d'un crayon très gras, deux rangées de quatre à huit carrés d'environ 4 cm de côté.

Les injections intradermiques sont faites au centre de chaque carré dessiné, à l'aide de seringues stériles graduées en 1/10 de millilitre

2 – PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS DE SANG

Les prélèvements sanguins ont été effectués sur les lapins par ponction cardiaque.

Nous avons utilisé, à cet effet, des seringues stériles de 5 à 10 millilitres, contenant quelques gouttes d'anticoagulant (solution d'héparine diluée à 25 mg pour 100 ml, additionnée de merthiolate de sodium à 1 pour 10.000). L'aiguille est rincée avant la ponction, avec cette solution de façon à éviter son obstruction par un caillot au cours de la prise de sang.

Les échantillons de sang ont d'abord été placés à l'étuve réglée à 37°C, puis en glacière, jusqu'à rétraction complète du caillot.

Le sérum, prélevé stérilement à la pipette Pasteur, a été recueilli dans des tubes à hémolyse stériles et éventuellement conservé dans un congélateur.

3 – INTRODUCTION DES SUPPOSITOIRES

Les suppositoires ont été introduits dans le rectum des lapins, à l'aide seringue, type seringue à insuline, dont on a scié puis rôdé la base fermée, de façon à obtenir un cylindre ouvert à ses deux extrêmités.

Le diamètre intérieur du corps de la seringue correspond au diamètre des suppositoires. (figure nº 9).

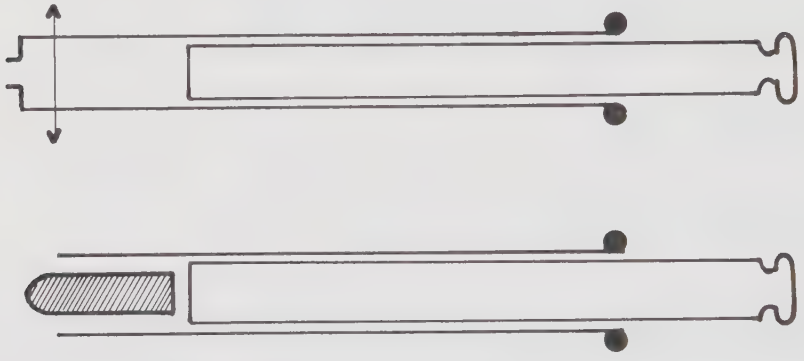


Figure nº 9

La seringue chargée de suppositoires, et huilée extérieurement, a été introduite dans le rectum, à une profondeur variable, 2 à 4 cm, suivant les cas ; les suppositoires sont expulsés dans l'ampoule rectale par pression sur le piston de la seringue.

Les lapins ont été, au préalable, gardés à jeûn pendant au moins 24 heures, puis observés pendant les 2 heures suivant l'administration. Aucun rejet n'a été observé.

D – METHODE DE TITRAGE

Rappelons qu'il s'agit de comparer la dose d'un échantillon de sérum antidiphtérique, nécessaire pour protéger le Lapin contre l'action dermonécrotique d'une dose donnée de toxine, avec la dose d'une préparation étalon de sérum antidiphtérique nécessaire pour obtenir la même protection.

1 – DETERMINATION DE LA DOSE Lr/1000 DE TOXINE

Elle représente la plus petite quantité de toxine qui, mélangée à

0,001 Unité Internationale Antitoxique (U.A.I.) et injectée par voie intradermique à des lapins, provoque en 24 à 48 heures, une réaction caractéristique au lieu d'injection (13-14 mm de diamètre).

La préparation de sérum étalon international est délivrée en solution contenant 10 U.A.I. par ml.

1 volume de sérum étalon est dilué avec 999 volumes d'eau peptonée stérile de sorte que **1 ml contient 0,01 Unité Internationale**.

Les mélanges sont préparés de telle sorte que 2 ml de chacun d'eux contiennent :

- 1 ml de préparation étalon international de sérum (0,01 U.A.I.),
- une quantité variable de toxine diphtérique sous un volume de 1 ml :

dans une série de tubes à essais, on prépare des dilutions suivantes de toxine dans de l'eau peptonée stérile : 1/750 - 1/1000 - 1/1250 - 1/1500 - 1/1750 - 1/2000 - 1/2250 - 1/2500.

Les mélanges sont abandonnés pendant une heure à la température du laboratoire.

Après une heure de contact 0,2 ml de chaque mélange est injecté, par voie intradermique, au centre de chaque carré dessiné, sur la peau rasée de deux lapins. On utilise, pour ce faire, des seringues de 1 ml graduées en dixièmes de millilitre.

Ayant effectué huit dilutions de toxine et ayant dessiné deux fois huit carrés sur chacun des deux lapins, nous pourrons faire quatre injections de la dilution, ce qui donnera quatre lectures pour chaque dilution.

La lecture est faite 48 h après les injections.

Les résultats sont reportés sur le tableau n° 1.

Dilutions de toxine (1 ml)	**Antitoxine Etalon** (1 ml)	**N° des carrés**	**Diamètre** (en mm) **de la réaction après 48 h**	
			Lapin n° 1	Lapin n° 2
1/750	0,01 UAI	1 - 1	> 20 > 20	> 20 > 20
1/1000	0,01 UAI	2 - 2	> 20 > 20	20 > 20
1/1250	0,01 UAI	3 - 3	20 19	18 19
1/1500	0,01 UAI	4 - 4	15 13	11 13
1/1750	0,01 UAI	5 - 5	0 0	0 0
1/2000	0,01 UAI	6 - 6	0 0	0 0
1/2250	0,01 UAI	7 - 7	0 0	0 0
1/2500	0,01 UAI	8 - 8	0 0	0 0

Tableau n° 1
Détermination de la dose Lr/1000 de toxine

La dose d'épreuve Lr/1000 de toxine présente dans 0,2 ml de mélange final, est celle qui provoque au lieu d'injection, une réaction moyenne de 13-14 mm après 48 h. D'après les résultats figurant sur le tableau n° 1, les carrés n° 4 présentent la réaction répondant à cette exigence.

Pour 0,2 ml injecté, nous avons 0,001 U.A.I. de sérum étalon et une dose Lr/1000 de toxine diluée au 1/1500.

La dilution au 1/1500 de toxine contient donc 10 doses Lr/1000 par ml.

2 – DETERMINATION DE L'ACTIVITE D'UN SERUM ANTITOXIQUE

La méthode de titrage par injection intradermique au Lapin (RÖMER et SAMES, 1909, FRASER et WIGHAM 1924) a été utilisée au cours de notre étude pour tous les dosages d'antitoxine :

- le titrage des réactifs antitoxiques que nous employons :

  sérum antidiphtérique de Mouton, purifié
  sérum antidiphtérique de Mouton, non purifié
  suppositoires

- le titrage des échantillons de sérum des lapins en expérience

La toxine est utilisée après dilution à 1 pour 1500 ; 1 ml contient 10 fois la dose Lr/1000.

Le sérum à essayer est dilué à différents titres.

Les différentes dilutions de sérum sont mélangées à un volume égal à la toxine de sorte que le volume total du mélange soit de 2 ml :

1 ml de dilution de toxine (10 doses Lr/1000)
\+ 1 ml de chaque dilution de sérum.

Les mélanges sont abandonnés pendant 1 heure à la température du laboratoire.

Une dose de 0,2 ml de chaque mélange (contenant donc 1 dose Lr/1000 de toxine) est injectée suivant le procédé que nous avons décrit ci-dessus, par voie intradermique au Lapin.

On détermine de la sorte la dilution de sérum à essayer pour laquelle, après 48 h, on observe sur le Lapin une réaction cutanée de 13 à 14 mm.

1 ml de cette dilution contient 0,01 U.A.I. puisque la même réaction a été obtenue avec le sérum étalon international contenant 0,01 U.A.I. par ml.

E – TECHNIQUE DE L'INTRADERMO-REACTION DE SCHICK

Nous avons employé la préparation d'étalon U.S.A. de toxine diphtérique pour réaction de Schick diluée d'après les indications du National Institude of Health.

La dilution est telle que 1 ml de toxine de Schick contient 10 doses pour intradermo-réaction de Schick.

Nous avons appliqué au Lapin l'intradermo-réaction de Schick pour apprécier son état d'immunité au cours de nos expériences.

Le Lapin est rasé et sa peau est nettoyée à l'alcool. On dessine, sur sa peau, des carrés de 4 cm de côté que l'on numérote. Une dose de toxine de Schick, soit 0,1 ml, est injectée au centre de chaque carré, aux temps choisis. La première injection se fait immédiatement après l'administration intramusculaire, intraveineuse ou rectale de sérum antitoxique. Sur un lapin neuf, cette injection provoque, après 48 heures, l'apparition d'une réaction cutanée fortement positive, de 20 mm ou plus de diamètre, avec nécrose, l'animal n'étant pas spontanément immunisé. Les injections suivantes seront faites successivement à des temps déterminés, au même moment que l'on pratique un prélèvement de sang sur le lapin, qui servira à déterminer son titre exact d'antitoxine.

On pourra ainsi comparer l'évolution de la réaction de Schick, témoignant de l'immunité du lapin, aux variations du titre en antitoxine de son sérum.

3 – RESULTAT DES EXPERIENCES

A – TITRAGE DES PREPARATIONS ANTITOXIQUES UTILISES

1 – SERUM ANTIDIPHTERIQUE DE MOUTON, PURIFIE

La toxine diphtérique est diluée extemporanément à 1 pour 1500 dans de l'eau peptonée stérile.

Nous avons préparé des dilutions croissantes du sérum antidiphtérique purifié de Mouton. Le sérum est d'abord dilué à 1 pour 50. Cette dilution nous a servi au cours de nos expériences comme solution stock.

A partir de cette solution stock à 1 pour 50, nous avons préparé les dilutions suivantes : 1/100 000 - 1/200 000 - 1/400 000 - 1/600 000 - 1/800 000 - 1/1000 000 - 1/2000 000 - 1/4 000 000.

Dans les petits verres à expérience stériles, nous avons effectué les mélanges suivants :

- toxine diluée 1/1500 : 1 ml
- chaque dilution de sérum : 1 ml

Les mélanges ont été abandonnés pendant 1 heure à la température du laboratoire.

Deux lapins albinos ont été préparés suivant le processus que nous avons décrit (page 26). Les carrés dessinés ont été numérotés de 1 à 8.

Chaque mélange, après contact de 1 heure, a été injecté dans les quatre carrés correspondants, sous un volume de 0,2 ml, ce qui nous a permis quatre lectures par injection (2 injections par lapin).

Quarante-huit heure après les injections, nous avons observé les réactions cutanées produites sur la peau des lapins. Les résultats ont été résumés sur le tableau suivant. (tableau n° 2).

Dilutions de sérum (1 ml)	**Toxine 1/1500** (1 ml)	**N° des carrés**	**Diamètre** (mm) **des réactions après 48 h**			
			Lapin n° 1		Lapin n° 2	
1/100 000	1 ml	1	0	0	0	0
1/200 000	-	2	0	0	0	0
1/400 000	-	**3**	**13**	**12**	**12**	**11**
1/600 000	-	4	20	22	24	22
1/800 000	-	5	> 20	> 20	> 20	> 20
1/1 000 000	-	6	> 20	> 20	> 20	> 20
1/2 000 000	-	7	> 20	> 20	> 20	> 20
1/4 000 000	-	8	> 20	> 20	> 20	> 20

Tableau n° 2
Titrage du sérum antidiphtérique, de Mouton, purifié

Les carrés n° 3 présentent une réaction moyenne de 12 mm. Le mélange qui a provoqué cette réaction contient, dans 0,2 ml :

- 1 dose Lr/1000 de toxine diphtérique
- 0,1 ml de la dilution 1/400 000 de sérum à essayer.

Ce mélange correspond à 0,001 U.A.I. de sérum antitoxique étalon.
Le titre du sérum à essayer est donc de 4 000 U.A.I. par ml, pour cette estimation.

Afin de préciser ce titrage, nous l'avons effectué de la même manière en préparant une nouvelle série de dilutions de sérum plus étroitement espacées : 1/250 000 - 1/300 000 - 1/350 000 - 1/375 000 - 1/400 000 - 1/425 000 - 1/450 000 - 1/500 000..

1 ml de chaque dilution est mélangé à 1 ml de toxine diluée au 1/1500, et les mélanges ont été laissés 1 heure en contact.

Les injections ont été faites par séries de trois lapins. Deux rangées de huit carrés sur chaque lapin nous permettent six injections par titrage, soit six lectures après 48 heures, par dilution de sérum.

Les résultats observés ont été les suivants ; nous donnons dans le tableau n° 3 les moyennes des diamètres des réactions cutanées :

Dilutions de sérum (1 ml)	**Toxine 1/1500**	**N° des carrés**	**Diamètres** (mm) **moyens des réactions après 48 h**	
1/250 000	1 ml	1	0	0
1/300 000	-	2	0	0
1/350 000	-	3	traces ou 0	10
1/375 000	-	4	**14**	**13**
1/400 000	-	5	17	17
1/425 000	-	6	> 20	> 20
1/450 000	-	7	> 20	> 20
1/500 000	-	8	> 20	> 20

Tableau n° 3
Titrage du sérum antidiphtérique, purifié, de Mouton

Les carrés n° 4 présentent la réaction cutanée caractéristique de 13 à 14 mm de diamètre. La réaction a été provoquée par l'injection sous un volume de 0,2 ml de 1 dose Lr/1000 de toxine diphtérique diluée et 0,1 ml de sérum antidiphtérique, purifié, dilué au 1/375000.

0,1 ml de cette dilution contient 0,001 U.A.I.

Le titre du sérum antidiphtérique de mouton peut être considéré comme étant de :

3750 U.A.I. par ml

2 – SERUM ANTIDIPHTERIQUE NON PURIFIE, DE MOUTON

Nous avons opéré, de la même façon que pour le sérum purifié, un premier titrage qui nous a donné un titre approximatif de 500 U.A.I. par ml.

Nous avons préparé, pour un titrage précis, une série de dilutions du sérum à essayer : 1/25 000 - 1/30 000 ; 1/35 000 - 1/40 000 - 1/45 000 - 1/50 000 - 1/55 000 - 1/60 000.

1 ml de chaque dilution est mélangé à 1 ml de toxine diphtérique, diluée au 1/1500. Les mélanges sont laissés 1 heure à la température du laboratoire. Les injections sont faites comme pour le titrage du sérum purifié, par séries de trois lapins.

Après 48 heures, nous avons observé les diamètres des réactions cutanées. Nous donnons dans le tableau n° 4, la moyenne, exprimée en millimètres, des diamètres observés.

Dilutions de sérum (1 ml)	**Toxine 1/1500**	**N° des carrés**	**Diamètres** (mm) **moyens des réactions après 48 h**	
1/25 000	1 ml	1	0	0
1/30 000	-	2	0	0
1/35 000	-	3	traces	0
1/40 000	-	4	traces	11
1/45 000	-	**5**	**13**	**15**
1/50 000	-	6	> 20	> 20
1/55 000	-	7	> 20	> 20
1/60 000	-	8	> 20	> 20

Tableau n° 4
Titrage du sérum antidiphtérique, non purifié, de Mouton

Les carrés n° 5 présentent une réaction cutanée caractéristique d'un diamètre moyen de 13 à 15 mm. Cette réaction a été provoquée par l'injection du mélange contenant sous un volume de 0,2 ml :

- 1 dose Lr/1000 de toxine diphtérique
- 0,1 ml de la dilution 1/45000 de sérum antidiphtérique non purifié

0,1 ml de cette dilution contient 0,001 U.A.I.

Le titre du sérum antidiphtérique non purifié, de Mouton, peut être considéré comme étant de :

450 U.A.I. par ml

3 – SUPPOSITOIRES DE SERUM ANTIDIPHTERIQUE, PURIFIE, DE MOUTON

Les suppositoires ont été préparés à partir du sérum purifié dont le titre a été estimé ci-dessus. Ce titre est de 3750 U.A.I. par ml.

Pour le titrage, un suppositoire est mis dans 100 ml d'eau peptonée à une température de 37° C à 40° C. Une agitation magnétique de quelques minutes permet d'obtenir un mélange homogène. A partir de cette dilution à 1 pour 100 on prépare une série de dilutions comprises entre 1/20 000 et 1/160 000. Le titrage est effectué suivant la technique exposée plus haut et utilisée pour titrer les sérums. La toxine est employée après dilution à 1 pour 1500.
Les injections sont faites également sur des séries de trois lapins.

Les réactions cutanées sont observées 48 heures après les injections. Nous donnons, dans le tableau n° 5, les diamètres moyens des réactions observées.

Dilutions de suppositoires (1 ml)	**Toxine 1/1500**	**N° des carrés**	**Diamètres** (mm) **moyens des réactions après 48 h**	
1/20 000	1 ml	1	0	0
1/40 000	-	2	0	0
1/60 000	-	3	0	traces
1/80 000	-	**4**	**10**	**12**
1/100 000	-	**5**	**16**	**20**
1/120 000	-	6	19	> 20
1/140 000	-	7	> 20	> 20
1/160 000	-	8	> 20	> 20

Tableau n° 5
Titrage des suppositoires de sérum antidiphtérique, purifié, de Mouton

Les carrés n° 4 présentent une réaction légèrement inférieure à la réaction caractéristique produite par 0,001 U.A.I. de sérum, sous un volume injecté de 0,2 ml ; les carrés n° 5 présentent une réaction légèrement supérieure. La dilution intermédiaire de 1/90 000, peut être considérée comme contenant 0,01 U.A.I. par millilitre.

Le titre des suppositoires de sérum antidiphtérique purifié, peut être considéré comme étant environ de :

900 U.A.I. par suppositoire

4 – SUPPOSITOIRES DE SERUM ANTIDIPHTERIQUE, NON PURIFIE, DE MOUTON.

Les suppositoires sont préparés à partir du sérum antidiphtérique de Mouton, titrant 450 U.A.I. par ml. Leur titrage est effectué avec une technique identique à la précédente. A partir d'une dilution au 1/100 des suppositoires dans l'eau peptonée, on prépare une série de dilutions de 1/10 000 à 1/30 000. 1 ml de chaque dilution est mélangé à 1 ml de toxine diphtérique diluée à 1 pour 1500.

Le tableau n° 6 rassemble les diamètres moyens des réactions cutanées, après 48 heures.

Dilution des suppositoires (1 ml)	**Toxine 1/1500**	**N° des carrés**	**Diamètres** (mm) **moyens des réactions après 48 h**	
1/10 000	1 ml	1	0	0
1/12 500	-	**2**	**13**	**14**
1/15 000	-	3	18	19
1/17 500	-	4	> 20	> 20
1/19 000	-	5	> 20	> 20
1/21 000	-	6	> 20	> 20
1/23 000	-	7	> 20	> 20
1/30 000	-	8	> 20	> 20

Tableau n° 6
Titrage des suppositoires de sérum antidiphtérique, non purifié, de Mouton

La dilution 1/12 500 provoque, avec 1 dose Lr/1000 de toxine, une réaction cutanée de 13-14 mm de diamètre, correspondant à 0,001 U.A.I. injectée sous un volume de 0,2 ml.

Le titre des suppositoires du sérum antidiphtérique non purifié, peut être considéré comme étant de :

125 U.A.I. par suppositoire

B – RESULTATS OBSERVES

1 – ADMINISTRATION DE SERUM ANTIDIPHTERIQUE, PURIFIE, DE MOUTON

Nous avons administré des doses variables de sérum antidiphtérique purifié, à des lapins, successivement par les voies intramusculaire et intraveineuse et nous avons fait une étude comparative de l'immunité obtenue.

B – *Administration intramusculaire de sérum purifié*

Le sérum antidiphtérique, purifié, de Mouton titrant 3750 U.A.I. par ml, la solution à 1 pour 50 que nous stockons titre 75 U.A.I. par millilitre.

Pour chaque série d'expériences, nous avons respectivement injecté à trois lapins, par voie intramusculaire, les volumes suivants de sérum purifié :

- 2 ml, soit 150 U.A.I.
- 0,7 ml, soit 52,5 U.A.I.
- 0,2 ml, soit 15 U.A.I.

A des temps choisis après l'administration du sérum (1, 8, 24, 48 heures, 3 jours), nous avons effectué simultanément sur chaque animal :

a) un prélèvement de sang, par ponction cardiaque, destiné au titrage des antitoxines ;

b) une intradermo-réaction de Schick, destinée à estimer l'état d'immunité du lapin en expérience.

a) **Titrage des échantillons de sérums prélevés**

Ayant effectué sur chaque lapin, cinq prélèvements aux temps donnés plus haut, nous avons à effectuer cinq titrages par animal traité.

La technique de titrage est celle que nous avons exposée et que nous avons utilisée pour les titrages des réactifs antitoxiques.

● Nous donnerons, ci-dessous, le détail des titrages effectués sur les sérums des lapins ayant reçu **150 U.A.I.** de sérum purifié par voie intramusculaire

Chaque échantillon de sérum (prélevé après 1 h, 8 h, 24 h, 48 h, 3 jours) a été dilué avec de l'eau peptonée stérile de façon à obtenir les dilutions suivantes : 0, 1/5, 1/10, 1/50.

1 ml de chaque dilution a été mélangé à 1 ml de toxine diphtérique diluée à 1 pour 1500. Les mélanges ont été laissés une heure à la température du laboratoire. Chaque mélange, sous un volume de 0,2 ml, a été injecté par voie intradermique (au minimum 4 à 6 injections par mélange) à des lapins neufs.

La lecture des réactions a été faite après 48 heures.

Lorsque les réactions cutanées observées avec les dilutions 0, 1/5, 1/10, 1/50 de sérum ne répondaient pas aux normes fixées, nous avons effectué des dilutions intermédiaires.

- Avec le premier échantillon de sérum (1 h).

La dilution 0 a donné une réaction négative = 0 mm
" 1/3,5 " " de = 13 mm
" 1/5 " " de = 18 mm
" 1/10 " " de > 20 mm

Ce qui indique un titre de 0,035 U.A.I. par ml.

- Avec le deuxième échantillon de sérum (8h.)

La dilution 0 a donné une réaction négative = 0 mm
" 1/5 " " " = 0 mm
" 1/10 " " de = 5 à 11 mm
" 1/15 " " de = 14 mm
" 1/50 " " de > 20 mm

Ce qui indique un titre de 0,15 U.A.I. par ml.

- Avec le troisième échantillon de sérum (24 h.)

La dilution 0 a donné une réaction négative = 0 mm
" 1/5 " " " = 0 mm
" 1/10 " " " = 0 mm
" 1/25 " " de = 14 mm
" 1/50 " " de > 20 mm

Ce qui indique un titre de 0,25 U.A.I. par ml.

- Avec le quatrième échantillon de sérum (48 h.)

La dilution 0 a donné une réaction négative = 0 mm
" 1/3,5 " " de = 13 mm
" 1/5 " " de = 20 mm
" 1/10 " " de > 20 mm
" 1/50 " " de > 20 mm

Ce qui indique un titre de 0,035 U.A.I. par ml.

- Avec le dernier échantillon de sérum (3 jours)

La dilution 0 a donné une réaction négative = 0 mm
" 1/2,5 " " de = 14 mm
" 1/5 " " de > 20 mm
" 1/10 " " de > 20 mm
" 1/50 " " de > 20 mm (*)

Ce qui indique un titre de 0,025 U.A.I. par ml.

---

* Les diamètres indiqués sont des diamètres moyens : quatre à six lapins ont reçu 150 U.A.I. de sérum ; chaque échantillon de sérum a été, pour chaque dilution, injecté au moins six fois pour le titrage.

Les titres ainsi obtenus, en fonction du temps séparant l'administration intramusculaire de 150 U.A.I. de sérum et les prises de sang, ont été portés sur une courbe (figure 10).

Nous avons inscrit les temps en abscisses et en ordonnées les titres obtenus exprimés en unités antitoxiques par millilitre de sérum prélevé.

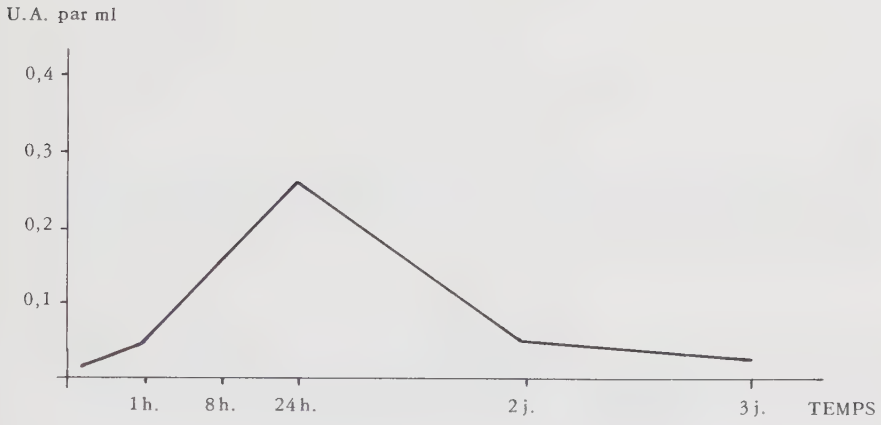


Figure n° 10
Evolution chronologique de l'antitoxine diphtérique sérique chez le Lapin après injection I.M. de 150 U.A.I. de sérum purifié

Nous observons que le titre maximum obtenu est de 0,25 U.A.I. par millilitre, et cette valeur est atteinte 24 heures après l'administration intramusculaire. 48 heures après l'administration de sérum, le titre sérique n'est plus que de 0,035 U.A.I. par ml et dimimue encore pendant les jours suivants.

● Utilisant les mêmes techniques de titrage, nous avons obtenu les titres sériques suivants, après injection intramusculaire de **52,5 U.A.I.** de sérum antidiphtérique, purifié, de Mouton :

Après 1 heure : moins de 0,01 U.A.I. par ml
Après 8 heures : 0,05 U.A.I. par ml
Après 24 heures : 0,035 U.A.I. par ml
Après 48 heures : 0,025 U.A.I. par ml
Après 3 jours : moins de 0,01 U.A.I. par ml

La courbe de la figure n° 11 montre l'évolution de ces titres :

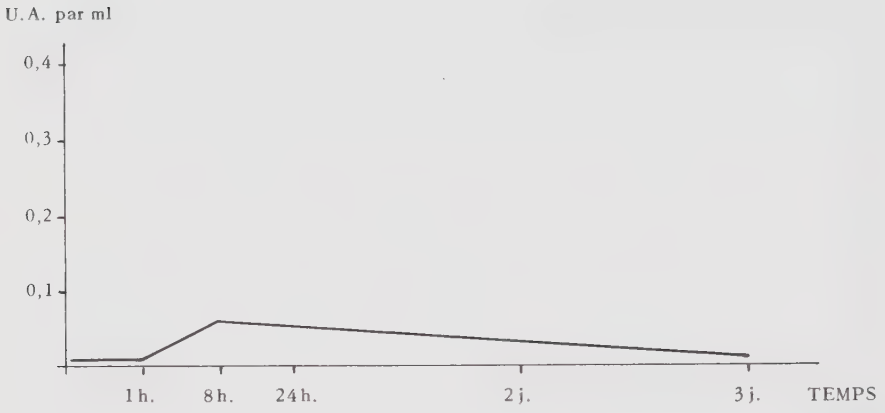


Figure n° 11
Evolution chronologique de l'antitoxine diphtérique sérique chez le Lapin après injection I.M. de 52,5 U.A.I. de sérum purifié

Le titre sérique maximum (0,05 U.A.I. par ml) est obtenu 8 heures après l'administration de sérum. Il est pratiquement nul après 3 jours.

● Après administration intramusculaire de **15 U.A.I.** de sérum antidiphtérique purifié, nous avons obtenu les titres sériques suivants :

Après 1 heure : moins de 0,01 U.A.I. par ml
Après 8 heures : " " " "
Après 24 heures : 0,01 U.A.I. par ml
Après 48 heures : moins de 0,01 U.A.I. par ml
Après 3 jours : " " " "

L'évolution de ces titres nous a permis d'établir la courbe suivante (figure n° 12)

Les titres obtenus sont très faibles ; inférieurs à 0,01 U.A.I. par ml, ils n'atteignent ce chiffre qu'après 24 heures, pour redevenir pratiquement nuls après 48 heures et 3 jours.

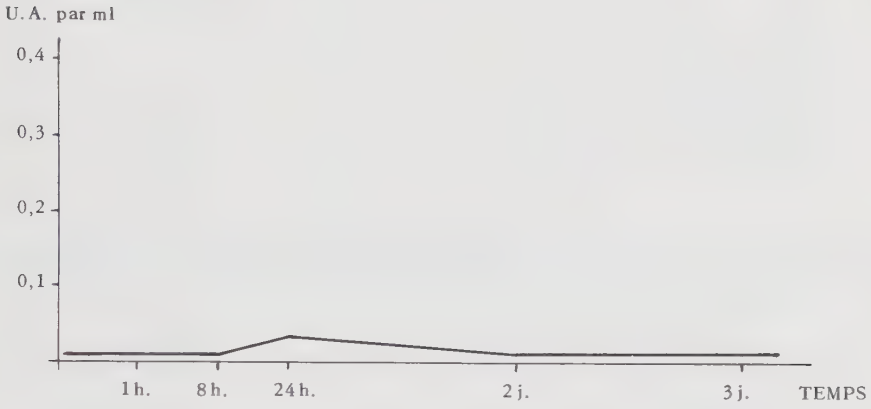


Figure nº 12

Evolution chronologique de l'antitoxine diphtérique sérique chez le Lapin immunisé (I.M.) par 15 U.A.I. de sérum purifié

b) **Résultats des intradermo-réactions de Schick**

Aux mêmes temps que nous prélèvions un échantillon de sang aux lapins ayant reçu respectivement 150 U.A.I., 52,5 U.A.I., 15 U.A.I. de sérum antidiphtérique purifié, nous pratiquions sur ces animaux des injections intradermiques d'une dose de toxine de Schick (0,1 ml de "toxine diphtérique diluée" pour réaction de Schick.

La lecture de ces réactions a été faite après quarante huit heures.

● Après administration de **150 U.A.I.** de sérum purifié, par voie intramusculaire, nous avons obtenu des réactions cutanées dont les diamètres moyens étaient les suivants :

Après 1 heure	14 mm
Après 8 heures	0
Après 24 heures	0
Après 48 heures	0
Après 3 jours	0

● Après administration de **52,5 U.A.I.** de sérum purifié, par voie intramusculaire, nous avons obtenu des réactions cutanées dont les diamètres moyens étaient les suivants :

Après 1 heure : 21,5 mm
Après 8 heures : 13 mm
Après 24 heures : 12 mm
Après 48 heures : 15 mm
Après 3 jours : 19 mm

● Après administration de **15 U.A.I.** de sérum purifié, par voie intramusculaire, nous avons obtenu des réactions cutanées dont les diamètres moyens étaient les suivants :

Après 1 heure : 28 mm avec nécrose
Après 8 heures : 24 mm
Après 24 heures : 18 mm
Après 48 heures : 17 mm
Après 3 jours : 27 mm avec nécrose

Les diamètres donnés sont des diamètres moyens : chaque injection intramusculaire ayant été faite sur quatre à six lapins ; de plus, sur un lapin, le test est effectué en double, de part et d'autre de l'épine dorsale.

La réaction de Schick est estimée positive à partir de 13-14 mm de diamètre. On peut observer que :

- pour 150 U.A.I. injectées, elle n'est positive que dans l'heure qui suit l'injection. L'animal est ensuite suffisamment immunisé pour être Schick-négatif.
- pour 52,5 U.A.I. injectées, elle ne peut être considéréecomme négative qu'entre 8 heures et 24 heures.
- pour 15 U.A.I. injectées, elle n'est jamais négative.

L'intradermo-réaction de Schick évaluant l'état d'immunité de l'animal en expérience, il est intéressant de comparer son évolution aux titres sériques d'antitoxine.

Nous avons, à cet effet, transcrit, sous forme de tableau (tableau nº 7), lestitres d'anticorpscirculants et les diamètres des réactions de Schick, en fonction du temps suivant l'administration intramusculaire de sérum antidiphtérique purifié :

Quantité de sérum injecté	TITRE D'ANTITOXINE CIRCULANTE U.A.I. par ml, après :				
	1 h	8 h	24 h	48 h	3 j
150 U.A.I.	0,035	0,15	0,25	0,035	0,025
52,5 U.A.I.	< 0,01	0,05	0,035	0,025	< 0,01
15 U.A.I.	< 0,01	< 0,01	0,01	< 0,01	< 0,01
Quantité de sérum injecté	**DIAMETRE SCHICK** (mm)				
150 U.A.I.	14	0	0	0	0
52,5 U.A.I.	21,5	13	12	15	19
15 U.A.I.	28 nécrose	24	18	17	27 nécrose

Tableau nº 7

Titre d'antitoxine sérique et diamètres des réactions de Schick chez le Lapin immunisé par le sérum purifié (voie IM)

Nous avons reporté les résultats sur des courbes, que nous avons disposées de façon synoptique afin d'établir plus nettement l'évolution comparée des titres d'anticorps et de la réaction de Schick (figure nº 13).

Si nous examinons le contenu du tableau nº 7 et les courbes de la figure nº 13, nous pouvons faire les observations suivantes :

- Pour chaque dose injectée, l'évolution des diamètres des réactions de Schick correspond bien à l'évolution des titres d'anticorps dans le sang circulant : la réaction de Schick atteint son minimum lorsque le titre sérique est maximum.

- Pour une dose importante (150 U.A.I.) injectée par voie intramusculaire, nous avons obtenu après 1 heure un titre de 0,15 U.A.I. par ml de sérum, puis, après 8 heures, un titre maximum de 0,25 U.A.I. par ml de sérum.

Ces titres sériques provoquent, en une heure, une annulation de la réaction de Schick qui persiste encore trois jours après l'injection.

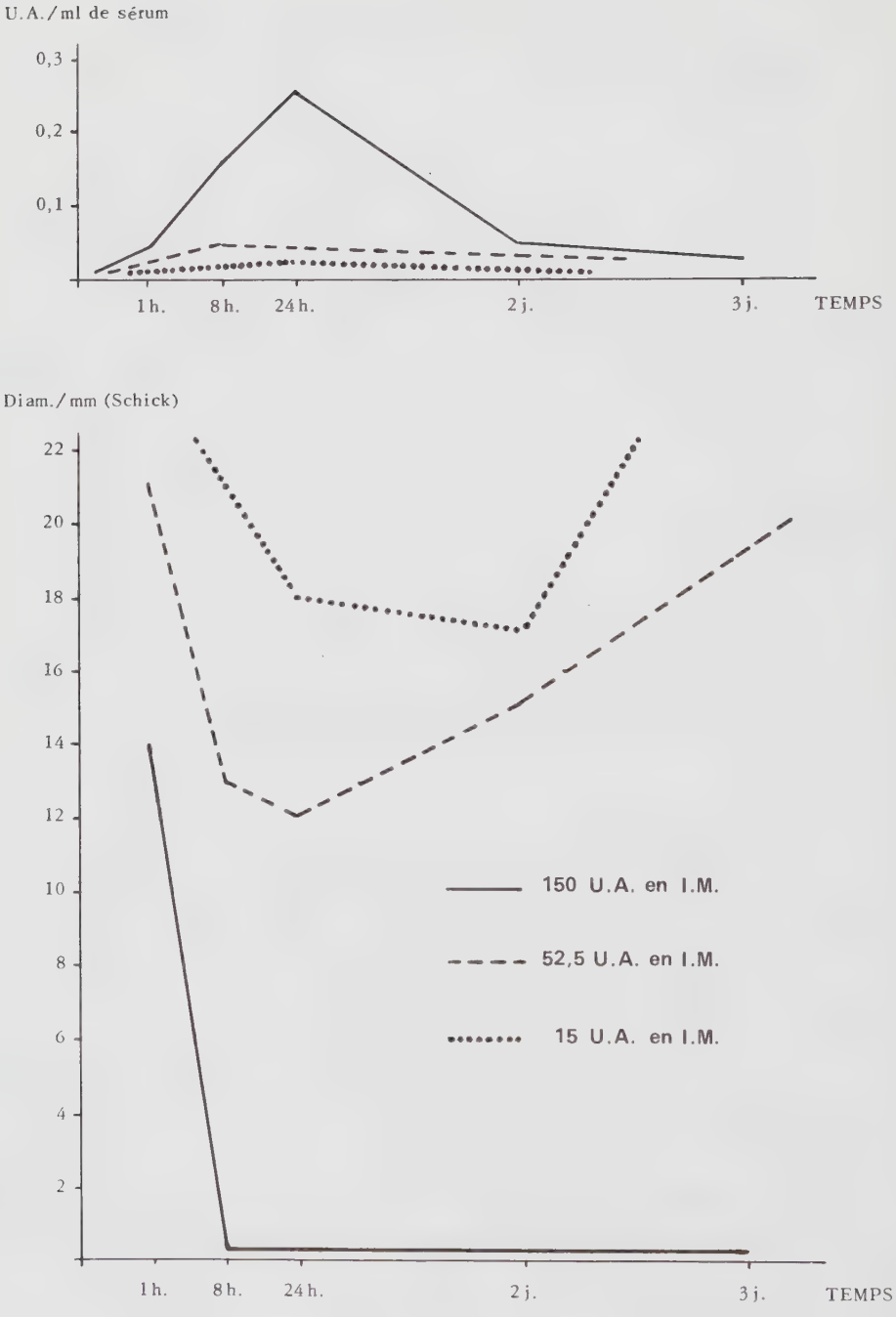


Figure nº 13
Administration I.M. de sérum purifié

Avec des doses inférieures : 52,5 U.A.I. et 15 U.A.I., on n'obtient jamais d'annulation totale de la réaction de Schick : pour 52,5 U.A.I. injectées, les diamètres minimum sont de 12 à 13 mm, après huit heures et vingt-quatre heures ; pour 15 U.A.I. injectées, la réaction caractéristique de 13 à 14 mm n'est jamais obtenue.

● On peut observer enfin, qu'après ces administrations par voie intramusculaire, l'immunité existe après 8 heures et jusqu'à 48 heures. Elle devient rapidement très faible après ce temps.

B – *Administration intraveineuse de sérum antidiphtérique purifié, de Mouton*

A trois lapins, nous avons respectivement injecté, dans la veine marginale de l'oreille, les mêmes quantités de sérum que celles utilisées dans les expériences précédentes :

- 2 ml, soit 150 U.A.I.
- 0,7 ml, soit 52,5 U.A.I.
- 0,2 ml, soit 15 U.A.I.

Chaque expérience utilise trois lapins, et est répétée au moins six fois.

Après 15 minutes, 1 heure, 8 heures, 24 heures, 48 heures, 3 jours, nous avons effectué, simultanément, sur chaque animal :

a) un prélèvement de sang par ponction cardiaque, destiné au titrage de l'antitoxine.

b) une intradermo-réaction de Schick destinée à estimer l'état d'immunité du lapin en expérience.

a) **Titrage des échantillons de sérums prélevés**

● La méthode de titrage est identique à celle utilisée précédemment. Nous donnerons, ci-dessous, le détail des titrages effectués sur les sérums des lapins ayant reçu par voie veineuse, 150 unités de sérum purifié.

Chaque échantillon de sérum, résultant des prises de sang effectuées après 1 h, 8 h, 24 h, 48 h, 3 jours, a été dilué, avec de l'eau peptonée, de façon à obtenir les dilutions suivantes :

0, 1/5, 1/10, 1/50, 1/75, 1/100

- 1 ml de chaque dilution a été mélangé à 1 ml de toxine diphtérique diluée au 1/1500. Les mélanges ont été laissés une heure à la température du laboratoire.

Chaque mélange, sous un volume de 0,2 ml, a été injecté par voie intradermique à des lapins neufs, à raison d'un minimum de quatre à six injections par mélange

La lecture a été faite 48 heures après les injections intradermiques. Les chiffres cités ci-dessous sont des diamètres moyens exprimés en mm.

- Avec le premier échantillon de sérum (1 heure)

La dilution	0	a donné une	réaction	négative	= 0 mm
"	1/5	"	"	"	= 0 mm
"	1/10	"	"	"	= 0 mm
"	1/50	"	"	"	= 0 mm
"	1/75	"	"	de	= 13 mm
"	1/100	"	"	de	= 20 mm

Ce qui indique un titre de **0,75 U.A.I. par ml**

- Avec le deuxième échantillon de sérum (8 heures)

La dilution	0	a donné une	réaction	négative	= 0 mm
"	1/5	"	"	"	= 0 mm
"	1/10	"	"	"	= 0 mm
"	1/25	"	"	de	= 10 mm
"	1/50	"	"	de	= 14 mm
"	1/100	"	"	"	> 20 mm

Ce qui indique un titre de **0,50 U.A.I. par ml**

- Avec le troisième échantillon de sérum (24 heures)

La dilution	0	a donné une	réaction	négative	= 0 mm
"	1/5	"	"	"	= 0 mm
"	1/10	"	"	de	= 8 mm
"	1/25	"	"	de	= 14 mm
"	1/50	"	"	de	> 20 mm
"	1/100	"	"	de	> 20 mm

Ce qui indique un titre de **0,25 U.A.I. par ml**

- Avec le quatrième échantillon de sérum (48 heures)

La dilution	0	a donné une	réaction	négative	= 0 mm
"	1/5	"	"	"	= 0 mm
"	1/10	"	"	"	= 0 mm
"	1/25	"	"	de	= 13 mm
"	1/50	"	"	de	= 20 mm
"	1/100	"	"	de	> 20 mm

Ce qui indique un titre de **0,25 U.A.I. par ml**

- Avec le cinquième échantillon de sérum (3 jours)

La dilution 0 a donné une réaction de 17 mm
" 1/5 et les dilutions plus fortes ont donné des réactions supérieures à 20 mm.

Ce qui indique un titre **inférieur à 0,01 U.A.I. par ml**

Les titres ainsi obtenus, en fonction des temps séparant l'administration veineuse et les prises de sang, sont reportés sur la courbe de la figure n° 14. En abscisses sont inscrits les temps, en ordonnées, les titres obtenus, exprimés en U.A.I. par millilitre de sérum.

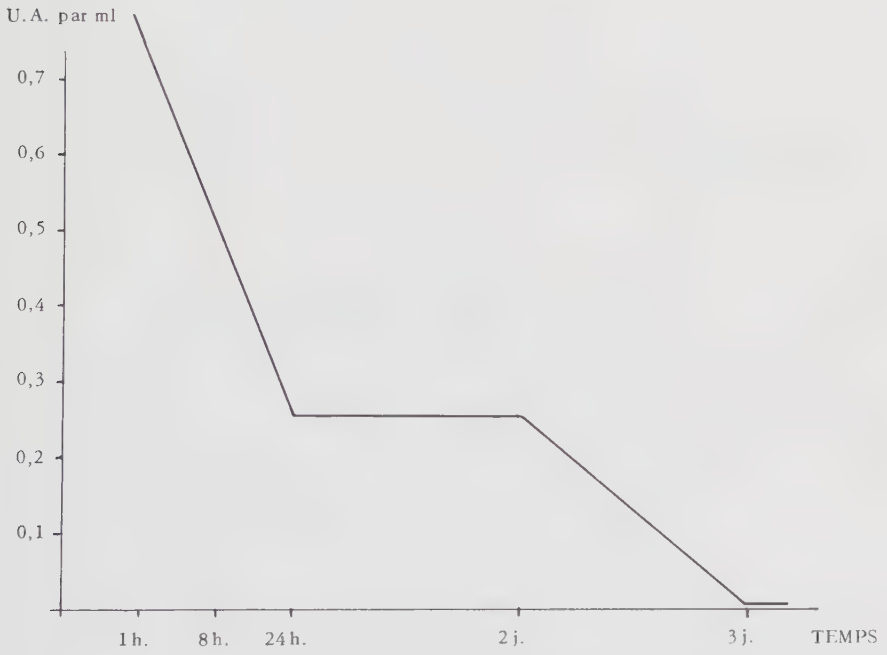


Figure n° 14
Evolution chronologique de l'antitoxine diphtérique sérique, chez le Lapin après injection I.V. de 150 U.A.I. de sérum purifié

Nous pouvons observer que le titre sérique d'antitoxine, après administration veineuse de 150 U.A.I. de sérum antidiphtérique purifié, est d'emblée maximum (0,75 U.A.I. par ml) dans l'heure qui suit. Il reste supérieur ou égal à **0,25 U.A.I.** par ml pendant quarante huit heures, pour diminuer ensuite jusqu'au troisième jour.

● Après administration par voie veineuse de 52,5 U.A.I. de sérum antidiphtérique purifié, nous avons, par la même méthode, obtenu les titres suivants :

Après 1 heure	0,25 U.A.I. par ml
Après 8 heures	0,25 U.A.I. par ml
Après 24 heures	0,05 U.A.I. par ml
Après 48 heures	0,025 U.A.I. par ml
Après 3 jours	moins de 0,01 U.A.I. par ml

Ces résultats ont été représentés sur la courbe de la figure n°15.

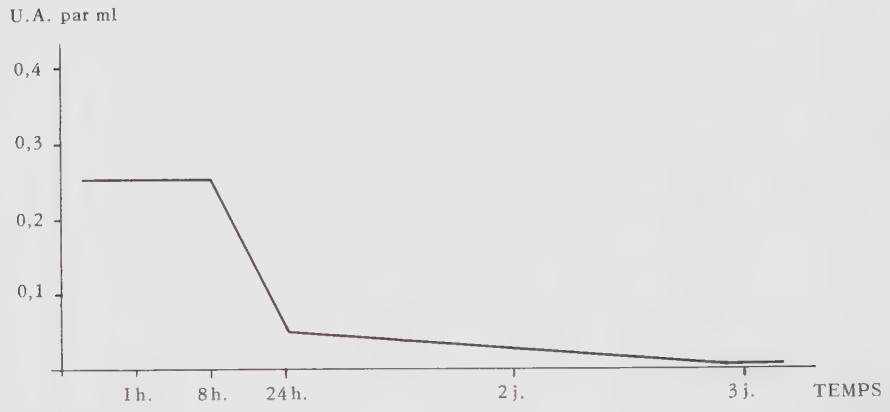


Figure n° 15
Evolution chronologique de l'antitoxine diphtérique sérique, chez le Lapin après injection I.V. de 52,5 U.A.I. de sérum purifié

Le titre sérique d'antitoxines, d'emblée maximum, reste supérieur à 0,05 U.A.I. par ml jusqu'à vingt-quatre heures. Après quarante-huit heures, il est encore de 0,025 U.A.I./ml et devient pratiquement nul après trois jours.

● Pour 15 U.A.I. injectées par voie veineuse, nous avons obtenu les titres sériques d'antitoxines suivants :

Après une heure :	0,10 U.A.I. par ml
Après 8 heures :	0,05 U.A.I. par ml
Après 24 heures, 48 heures et 3 jours :	moins de 0,01 U.A.I. par ml

Ces résultats ont été reportés sur la courbe de la figure nº 16.

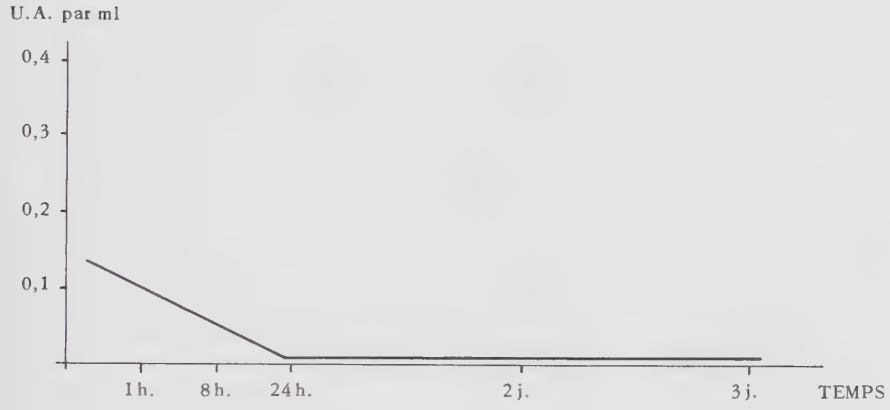


Figure nº 16

Evolution chronologique de l'antitoxine diphtérique sérique, chez le Lapin après injection I.V. de 15 U.A.I. de sérum purifié

Les titres obtenus restent supérieurs à 0,01 U.A.I. jusquà vingt-quatre heures après l'injection.

b) **Résultats des intradermo-réactions de Schick**

L'administration par voie veineuse de sérum antidiphtérique purifié apportant d'emblée les antitoxines dans la circulation, nous avons fait une première injection intradermique de toxine de Schick au lapin en expérience en même temps qu'étaient pratiquée l'injection intraveineuse de sérum, puis une autre, quinze minutes après l'injection de sérum. Nous avons ensuite répété ces injections après 1 heure, 8 heures, 24 heures, 48 heures et 3 jours.

L'intradermo-réaction de Schick a été effectuée, comme pour les expériences précédentes par injections intradermiques d'une dose de toxine de Schick (0,1 ml).

La lecture des diamètres des réactions obtenues a été faite après 48 heures.

● Après administration de **150 U.A.I.**, de sérum purifié, les diamètres moyens des réactions étaient les suivants :

Au temps 0	0 mm
Après 15 minutes :	0 mm
Après 1 heure :	0 mm
Après 8 heures :	0 mm
Après 24 heures :	0 mm
Après 48 heures :	0 mm
Après 3 jours :	0 mm

● Après administration de **52,5 U.A.I.** :

Au temps 0	13 mm
Après 15 minutes :	0 mm
Après 1 heure :	0 mm
Après 8 heures :	0 mm
Après 24 heures :	0 mm
Après 48 heures :	13 mm
Après 3 jours :	> 20 mm

● Après administration de **15 U.A.I.**

Au temps 0 ;	17 mm
Après 15 minutes :	14 mm
Après 1 heure :	0 mm
Après 8 heures :	0 mm
Après 24 heures :	11 mm
Après 48 heures :	> 20 mm
Après 3 jours :	> 20 mm

Nous pouvons observer que, pour 150 U.A.I., injectées par voie veineuse, l'intradermo-réaction de Schick est négative pendant toute la durée de l'expérience : la dose massive d'antitoxine apportée directement dans la circulation provoque immédiatement l'annulation de la réponse cutanée, qui persiste encore trois jours après

- Pour 52,5 U.A.I. injectées par voie veineuse, la réaction est négative entre 15 minutes et 24 heures après l'injection.

- Pour 15 U.A.I. injectées par voie veineuse, la réaction est négative entre la première et la huitième heure qui suivent l'injection.

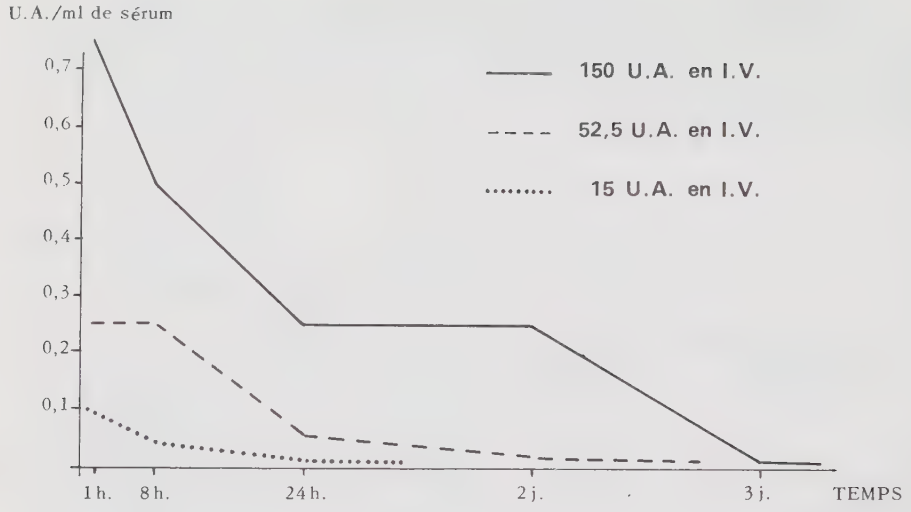
Comme nous l'avons fait pour les résultats des injections intramusculaires de sérum, nous avons transcrit, dans le tableau n° 8, les titres sériques d'antitoxine, et les diamètres des réactions de Schick, en fonction du temps séparant le titrage et l'intradermo-réaction de l'administration par voie veineuse de sérum purifié.

Quantités de sérum injecté	TITRES D'ANTITOXINES CIRCULANTES U.A.I. par ml, après :						
	0	15 m	1 h	8 h	24 h	48 h	3 j
150 U.A.I.			0,75	0,50	0,25	0,25	< 0,01
52,5 U.A.I.			0,25	0,25	0,05	0,025	< 0,01
15 U.A.I.			0,10	0,05	<0,01	< 0,01	< 0,01
Quantités de sérum injecté	**DIAMETRE SCHICK** (mm)						
150 U.A.I.	0	0	0	0	0	0	0
52,5 U.A.I.	13	0	0	0	0	13	> 20
15 U.A.I.	17	14	0	0	11	> 20	> 20

Tableau n° 8

Titres d'antitoxine sérique, et diamètres des réactions de Schick, chez le Lapin immunisé (voie I.V.) par le sérum purifié

Ces résultats ont été également reportés sur les courbes de la figure n° 17.



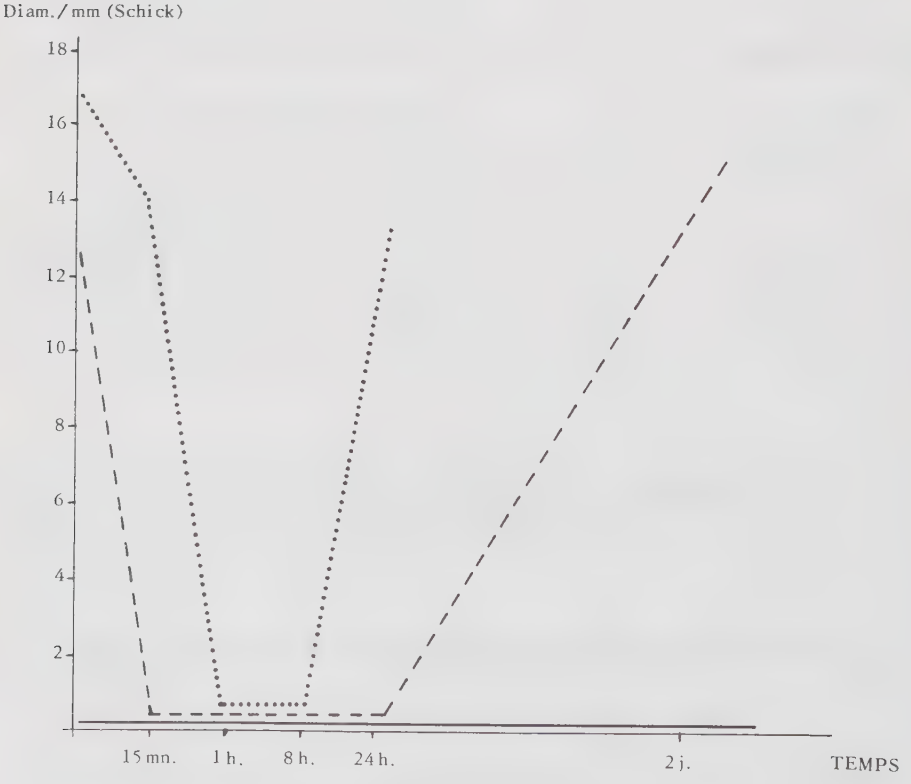


Figure nº 17
Administration I.V. de sérum purifié

c) **Etude comparative des résultats**

Les résultats de ces expériences peuvent être analysés comme suit :

1 - le titre d'antitoxine sérique
2 - la persistance de l'antitoxine
3 - la neutralisation d'une dose de toxine diluée pour réaction de Schick.

1 – TITRE D'ANTITOXINE SERIQUE

● L'injection intraveineuse de l'antitoxine doit, en principe, donner immédiatement un titre d'antitoxine sérique, proportionnel à la dilution dans le sang circulant ; c'est-à-dire au rapport : quantité injectée/volume sérique. Pour un lapin moyen, pesant 2,500 Kg, d'un volume sérique approximatif de 135 ml, on devrait trouver des titres maximum, d'emblée de :

$\frac{150}{135}$ soit 1,10 U.A.I. par ml, pour 150 U.A.I. injectées par voie veineuse ;

$\frac{52,5}{135}$ soit 0,39 U.A.I. par ml, pour 52,5 U.A.I. injectées par voie veineuse ;

$\frac{15}{135}$ soit 0,10 U.A.I. par ml, pour 15 U.A.I. injectées par voie veineuse ;

Nous voyons que les résultats de nos titrages sont assez proches de ces titres théoriques, puisque, une heure après l'injection intraveineuse de sérum, nous avons trouvé par l'expérience :

0,75 - 0,25 - 0,10 U.A.I. par ml.

En revanche, ces titres ne sont jamais atteints après injection intramusculaire, les titres maximum étant de :

0,25 - 0,05 - 0,01 U.A.I. par ml.

● Si l'on considère que le titre d'antitoxine circulante doit être au moins égal à 0,01 U.A.I. par ml, pour donner une protection, nous voyons que ce titre est atteint vingt-quatre heures seulement après l'injection intramusculaire de la plus faible quantité d'antitoxine (15 U.A.I.) et qu'il redevient inférieur à 0,01 U.A.I. par ml, par la suite. Ce titre sérique reste inférieur à 0,01 U.A.I. par ml, dans l'heure qui suit l'injection intramusculaire de 52,5 U.A.I., et est de l'ordre de 0,035 U.A.I. par ml, une heure après l'injection intramusculaire de 150 U.A.I. Ceci nous permet de conclure, que la diffusion du sérum antitoxique, après injection intramusculaire est très lente.

En effet, le titre maximum d'antitoxine, immédiat après l'injection intraveineuse, n'est atteint que vingt-quatre heures après l'injection intramusculaire.;

la quantité maximum retrouvée est de 0,75 U.A.I. par ml, après l'injection intraveineuse, et de seulement 0,25 U.A.I. par ml après l'injection intramusculaire, pour 150 U.A.I. injectées

Ainsi donc, pour 150 U.A.I., la quantité maximum d'antitoxine circulante après injection intramusculaire de sérum antitoxique, est environ le tiers de la quantité maximum retrouvée après injection intraveineuse ;

pour 52,5 U.A.I. de sérum antitoxique injectées, le rapport :

$$\frac{\text{anticorps circulants après injection intramusculaire}}{\text{anticorps circulants après injection intraveineuse}}$$ est de 1/5 ;

pour 15 U.A.I. de sérum antitoxique injectées, le rapport :

$$\frac{\text{anticorps circulants après injection intramusculaire}}{\text{anticorps circulants après injection intraveineuse}}$$ est de 1/10.

Plus la quantité injectée est faible, plus le rapport diminue.

2 – PERSISTANCE DES ANTITOXINES

Nous venons de voir que les antitoxines atteignent dans la circulation un titre nettement supérieur après injection intraveineuse. Les figures 13 et 17 nous indiquent aussi que ce titre élevé d'antitoxines persiste beaucoup plus longtemps que lorsque l'administration se fait par voie intramusculaire.

Ceci est en contradiction avec ce qui est généralement admis, à savoir que : l'injection intramusculaire donnerait une diffusion lente dans l'organisme, avec également une élimination lente des antitoxines injectées. Alors que l'introduction intraveineuse au contraire, serait plus favorable à une élimination rapide des antitoxines.

Or, les résultats de nos expériences montrent que le titre en antitoxine du sérum sanguin, après injection intraveineuse, est plus durable, et nettement plus élevé, qu'après injection intramusculaire :

- Pour 150 U.A.I. injectées par voie intraveineuse, le titre, dans les premières heures diminue de 0,75 à 0,25 U.A.I. par ml et il reste de 0,25 U.A.I. par ml jusqu'à 48 h.

Après introduction intramusculaire, il augmente de 0,035 U.A.I. à 0,25 U.A.I. par ml avant vingt-quatre heures et diminue ensuite jusqu'à 0,035 U.A.I. par ml entre vingt-quatre et quarante-huit heures.

- Les figures 13 et 17, montrent que la persistance des antitoxines est supérieure, dans tous les cas, lorsque l'on utilise la voie intraveineuse comme voie d'introduction de doses variables d'antitoxines.

Ces résultats concordent avec les travaux de TASMAN, puisque les expériences de cet auteur l'ont amené à conclure que le sérum injecté par voie intraveineuse n'est pas excrété plus rapidement que s'il est administré par voie intramusculaire et qu'il donne d'emblée un titre élevé d'antitoxine dans la circulation.

3 – NEUTRALISATION D'UNE DOSE POUR INTRADERMO-REACTION DE SCHICK

Il nous a semblé particulièrement intéressant d'étudier la neutralisation d'une petite quantité (0,1 ml) de toxine dermonécrotique, injectée chez l'animal en expérience. On peut, de cette façon, évaluer, d'une manière plus ou moins précise, l'action antitoxique ou thérapeutique des anticorps circulants.

- l'examen de la figure 17 qui représente la neutralisation de la réaction de Schick, après injections intraveineuses de différentes quantités d'antitoxines, nous révèle un fait évident :

● l'injection intraveineuse de 150 U.A.I. amène une neutralisation immédiate de la réaction dermo-nécrotique, même si la toxine a été injectée juste avant l'antitoxine au temps 0. Cette neutralisation persiste au moins pendant les trois jours qui suivent l'injection.

● la plus faible quantité injectée, soit 15 U.A.I. donne encore une réaction très faible après quinze minutes mais d'autre part, l'antitoxine circulante neutralise la toxine pendant des temps allant de une heure à vingt-quatre heures comme le montrent le tableau nº 8 et la figure nº 17.

- si l'on compare, en ce qui concerne les réactions de Schick, les figures 14 et 17, on voit que :

● la quantité la plus élevée d'antitoxine injectée par voie intramusculaire, neutralise partiellement la toxine après une heure, (diamètre de réaction = 14 mm) et ne la neutralise entièrement qu'après huit heures.

● dans les deux autres cas, il n'y a jamais de neutralisation totale :
Pour 52,5 U.A.I. injectées, on a une réaction dermique de 13 mm de diamètre et cette neutralisation partielle persiste après vingt-quatre heures pour devenir de 15 mm et plus, après quarante-huit heures.
Pour 15 U.A.I. injectées par la voie intramusculaire, on n'a jamais de neutralisation de la réaction dermique.

2 – ADMINISTRATION DE SERUM ANTIDIPHTERIQUE NON PURIFIE, DE MOUTON

En considérant les résultats précédents, nous avons voulu vérifier si la diffusion du sérum antidiphtérique, lente après introduction intramusculaire, ne serait pas en rapport avec la dégradation que les molécules polypeptidiques subissent au cours de la digestion enzymatique que comporte la purification des sérums.

A cet effet, nous avons renouvelé les expériences décrites ci-dessus, en utilisant, cette fois, un sérum antidiphtérique de Mouton, non purifié c'est-à-dire, non digéré.

Le titre de ce sérum a été évalué à 450 U.A.I. par millilitre.

Nous avons utilisé une dilution au dixième de ce sérum, titrant ainsi 45 U.A.I. par ml. La dose de 1,2 ml de ce sérum correspond à 54 U.A.I. et est pratiquement équivalente à la dose de sérum purifié (52,5 U.A.I.) que nous avions injectée par les voies veineuse et musculaire.

Dans chaque série d'expériences, deux lapins ont reçu 1,2 ml de cette dilution de sérum non purifié, respectivement par la voie intramusculaire et par la voie veineuse. Les expériences ont été répétées au moins dix fois.

Temps suivant injections IV - IM		1 h	8 h	24 h	48 h	3 j	4 j	5 j	7 j	9 j	12 j
		TITRES D'ANTITOXINES CIRCULANTES APRES 54 U.A.I. de SMNP, UAI/ml									
I.V.		0,50	0,45	0,35	0,25	0,20	0,10	0,075	<0,01	<0,01	<0,01
I.M.		0,01	0,25	0,25	0,25	0,25	0,05	0,025	<0,01	<0,01	<0,01
	Temps 0	**DIAMETRES SCHICK** (mm)									
I.V.	0	0	0	0	0	0	0	traces	> 20	> 20	> 20
I.M.	> 20	17	0	0	0	0	7	14	> 20	> 20	> 20

Tableau nº 9

Titres d'antitoxine sérique et diamètres des réactions de Schick, chez le Lapin immunisé par le sérum non purifié (voies IM et IV)

Les prélèvements de sang ont été faits par ponction cardiaque, 1 heure, 8 heures, 24 heures, 48 heures, 3, 4, 5, 6, 7, 9. 12 jours après l'administration de sérum. Simultanément, aux mêmes temps, chaque lapin a reçu une dose pour intradermo-réaction de Schick par voie intradermique. Les titrages ont été effectués suivant la technique habituelle.

Les résultats des titrages, exprimés en U.A.I. par millilitre de sérum prélevé, et les diamètres moyens des intradermo-réactions de Schick ont été consignés dans le tableau n° 9.

On peut à nouveau constater que les titres obtenus après administration veineuse de sérum, atteignent immédiatement un titre maximum d'antitoxine : 0,50 U.A.I. par ml et sont plus élevés qu'après administration intramusculaire.

L'élimination des anticorps est aussi plus lente que par voie intramusculaire.

Les mêmes observations sont aussi valables pour la réaction de Schick : après injection intraveineuse, elle est neutralisée pendant plus de cinq jours, tandis qu'après injection intramusculaire, la neutralisation n'est plus que partielle à partir du quatrième jour. Notons aussi qu'une dose de toxine de Schick injectée juste avant l'introduction intraveineuse d'antitoxine, soit au temps 0, est complètement neutralisée, ce qui n'est pas le cas si l'on utilise la voie intramusculaire.

Afin de comparer ces résultats à ceux que nous avions obtenus après administration de sérum antidiphtérique purifié, nous les avons juxtaposés sur les courbes des figures n° 18 et 19.

La figure n° 18 réunit les résultats obtenus après les injections intramusculaires des sérums purifié et non purifié. La figure n° 19 rapporte les résultats obtenus après les injections intraveineuses des sérums purifié et non purifié.

● En comparant les titres d'antitoxine obtenus avec le sérum purifié et le sérum non purifié, nous pouvons faire une constatation, à nos yeux très importante :

Les titres d'antitoxine sont plus élevés et leur persistance dans la circulation est plus durable avec le sérum non purifié, quelle qu'en soit la voie d'introduction.

- Après injection intramusculaire, le sérum purifié donne à 8 heures un titre maximum de 0,05 U.A.I. par ml, alors que l'on atteint à 8 heures, avec le sérum non purifié, un titre d'antitoxine de 0,25 U.A.I. par ml, titre qui se maintient pendant 3 jours et ne disparaît qu'au 7ème jour.

- Après injection intraveineuse, l'écart des titres d'antitoxine est encore élevé :

Le titre maximum obtenu avec le sérum purifié est de : 0,25 U.A.I. par ml.

Il est de 0,50 U.A.I. par ml avec le sérum non purifié. De plus, les antitoxines, disparues de la circulation au bout de 3 jours après l'injection de sérum purifié, persistent 7 jours après l'injection de sérum non purifié.

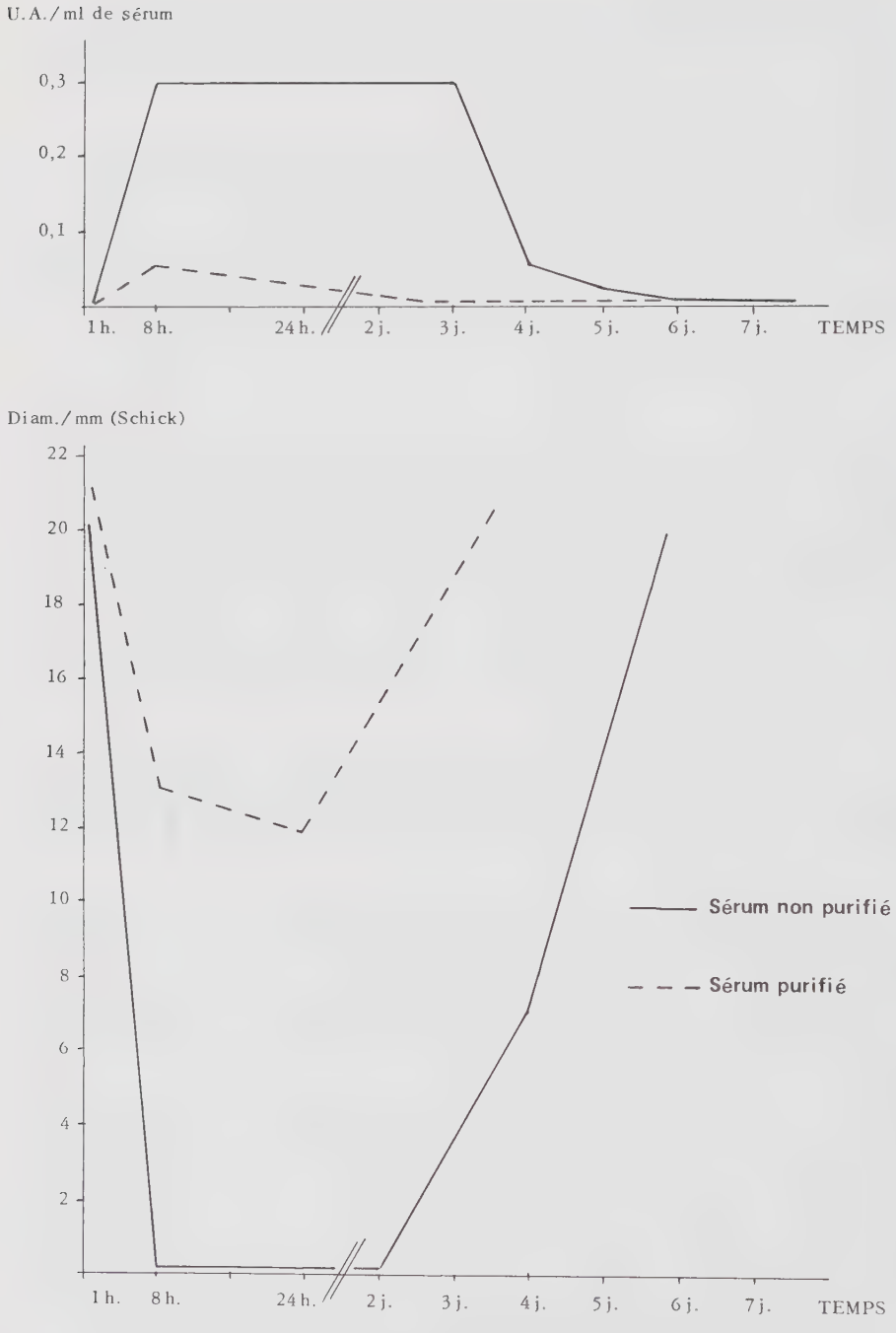
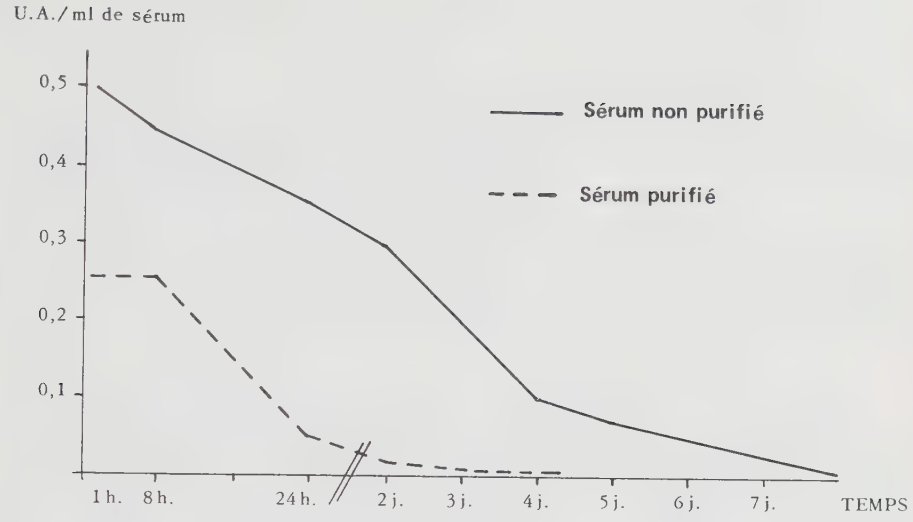


Figure nº 18
Administration I.M.



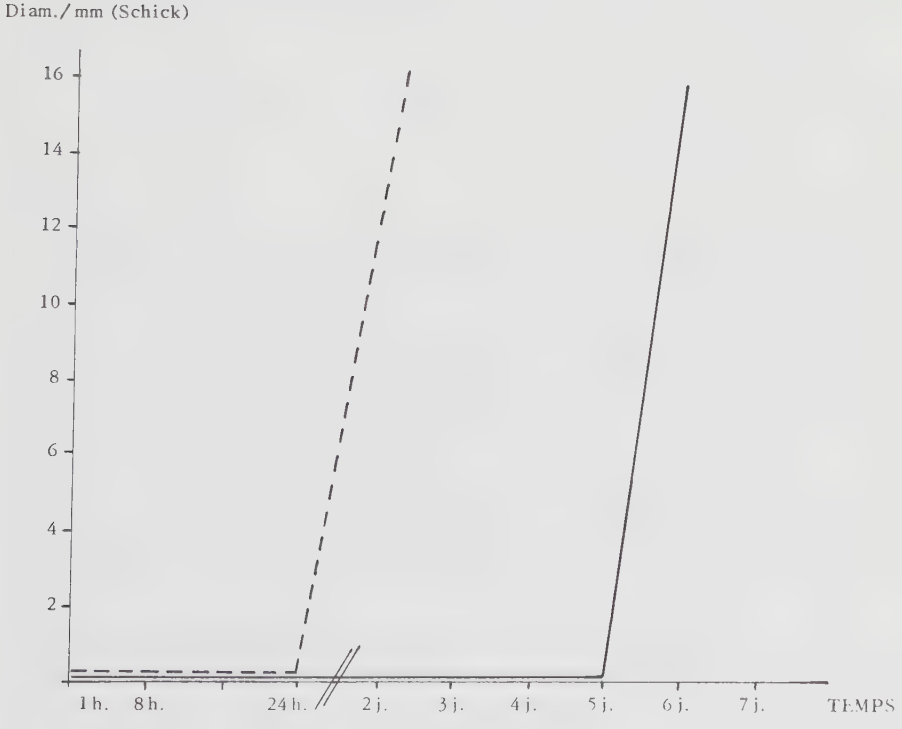


Figure nº 19
Administration I.V.

● Ceci est également valable en ce qui concerne la neutralisation de la réaction de Schick :

Le sérum non purifié neutralise pendant beaucoup plus longtemps la toxine introduite par voie intra-dermique :

La réaction dermonécrotique est négative pendant les vingt-quatre heures qui suivent l'injection intraveineuse de sérum purifié, tandis qu'elle reste négative cinq jours après l'injection intraveineuse de sérum non purifié.

Si l'on injecte le sérum purifié par voie intramusculaire, la réaction dermo-nécrotique n'est jamais négative pour la dose injectée tandis que, avec la même dose de sérum non purifié, toujours injectée par voie intramusculaire, la réaction devient négative après une heure et ne redevient positive qu'après quatre jours.

Nous pouvons donc conclure qu'une même quantité d'anticorps non purifiés par digestion enzymatique, introduitepar voie intraveineuse ou intra-musculaire donne des titres sériques plus élevés, plus durables, et neutralise la toxine de Schick plus longtemps que si elle est apportée par un sérum purifié par digestion.

3 – ADMINISTRATION DE SERUM ANTIDIPHTERIQUE DE MOUTON PAR VOIE RECTALE

1) Sérum purifié

Nous avons voulu, dans un premier temps, étudier le passage du sérum antidiphtérique purifié, de Mouton, par voie rectale, chez le Lapin et, à cet effet, nous avons préparé des suppositoires titrant 37,5 U.A.I. par suppositoire.

Nous avons introduit, dans le rectum des lapins, des doses variables d'antitoxines sous forme de suppositoires :

1° série : deux lapins : 3 suppositoires, soit : 112,5 U.A.I.
2° série : " : 4 suppositoires, soit : 150 U.A.I.
3° série : " : 6 suppositoires, soit : 225 U.A.I.

Les prélèvements de sang ont été effectués après des temps variables, soit 1, 8, 24, 48 heures après l'introduction des suppositoires.

Le titrage de l'antitoxine dans chaque échantillon a montré que le titre d'antitoxine était toujours inférieur à 0,001 U.A.I. par ml.

Les intradermo-réactions de Schick, effectuées aux mêmes temps, ont toujours été fortement positives ; les diamètres restant supérieurs à 20 mm et une nécrose étant toujours observable.

Nous en avons conclu qu'il n'y a pas eu passage d'antitoxine à travers la muqueuse rectale.

Dans une seconde série d'expériences, nous avons préparé des suppositoires de concentration beaucoup plus élevée en antitoxine ; soit 830 U.A.I. par suppositoire.

Deux lapins ont à nouveau reçu trois suppositoires, soit 2500 U.A.I. Après les mêmes temps, les titrages effectués sur des échantillons de sang suivant la technique habituelle, ne révèlent pas la présence d'antitoxine sérique, le titre du sérum est toujours inférieur à 0,001 U.A.I. par millilitre. Les réactions de Schick sont restées également très positives.

Ces résultats nous ont amenés à conclure qu'en utilisant un sérum antitoxique purifié, il n'y avait pas de passage d'antitoxine, à travers la muqueuse rectale, même en mettant en œuvre de fortes doses de sérum.

2) **Sérum non purifié**

Dans les expériences précédentes menées en utilisant des voies parentérales, nous avons constaté que le sérum non purifié diffuse beaucoup plus rapidement et en plus grande quantité.

Il était normal de vouloir chercher à savoir si le sérum non purifié franchirait plus facilement la muqueuse rectale que le sérum purifié étudié ci-dessus.

Les suppositoires, préparés avec le sérum non purifié, titrent 125 U.A.I. par unité. Les expériences sont menées sur des séries de deux lapins :

- les animaux de la première série ont reçu quatre suppositoires, soit 500 U.A.I.
- ceux de la deuxième série ont reçu six suppositoires, soit 750 U.A.I.

Nous avons observé un titre sérique très faible d'antitoxine et seulement dans le sang des lapins ayant reçu six suppositoires. Ce titre est de 0,01 U.A.I. par ml, huit à vingt-quatre heures après l'introduction.

Chez les lapins ayant reçu quatre suppositoires, nous n'avons jamais observé d'antitoxine circulante. La réaction de Schick a toujours été positive, avec quatre ou six suppositoires.

Nous pouvons donc conclure qu'avec des suppositoires de titre élevé en antitoxine il y a faible passage de cette antitoxine, à condition d'utiliser un sérum non purifié pour leur préparation.

QUATRIEME PARTIE

DISCUSSION

Nos expériences nous ont amenée à conclure que le titre d'anticorps spécifiques circulants, apparus après administration de sérum antidiphtérique, est toujours plus important lorsqu'on utilise un sérum non digéré au cours de sa purification. Et ce fait a été vérifié quelle que soit la voie d'introduction utilisée : intramusculaire, intraveineuse et rectale, bien que dans ce dernier cas, le passage des anticorps dans la circulation soit très faible.

L'interprétation de cette importante différence de comportement rend nécessaire la connaissance des données actuelles concernant la structure moléculaire des immunoglobulines et les modifications structurales entraînées par la digestion enzymatique utilisée par les procédés de purification.

Les études, précédemment citées sur la structure des anticorps peuvent fournir une interprétation des résultats observés lors des expériences de diffusion des globulines purifiées et non purifiées.

La purification des sérums thérapeutiques se fait par digestion pepsique et nous avons vu que ce traitement a pour effet : de donner une fraction $(Fab')_2$, bivalente, ayant gardé le pouvoir neutralisant et précipitant du sérum, de scinder la fraction moléculaire Fc en polypeptides, qui seront éliminés au cours de la purification.

Les préparations digérées par la pepsine sont donc privées d'un fragment porteur de diverses activités biologiques, ce qui pourrait expliquer l'obtention de titres d'anticorps circulants supérieurs après l'injection intramusculaire du sérum non digéré, au cours de sa purification.

Les γ globulines du système intra-vasculaire diffusent en effet à travers les membranes des capillaires dans le liquide interstitiel et retournent dans la circulation par les vaisseaux lymphatiques. Un changement de leur structure peut empêcher leur retour normal dans la circulation, ce qui peut être vrai également pour les γ globulines d'une autre espèce.

Les γ globulines non digérées passent au contraire normalement et les titres d'anticorps dans la circulation sont sensiblement les mêmes, huit heures après injection intraveineuse ou intramusculaire quand l'équilibre de diffusion s'est établi.

Nous avons trouvé, dans les publications d'autres auteurs, des résultats analogues sur le passage des immunoglobulines :

- En 1959, BRAMBELL, HEMMINGS et OAKLEY ont étudié les différences de passage placentaire des sérums antidiphtérique et antitétanique de Lapin, suivant qu'ils les utilisent intacts ou digérés par la pepsine. Ils effectuent ces expériences par injection des sérums dans la cavité utérine de Lapine et ils évaluent ensuite la concentration des anticorps dans la circulation foetale. Ils observent alors un passage des antitoxines digérées par la pepsine, nettement plus lent et plus faible, comparé à celui des antitoxines naturelles.

- En 1960, les mêmes auteurs, tenant compte des expériences de PORTER citées plus haut, étudient et comparent le passage, dans la circulation foetale du Lapin, des fractions résultant de la digestion papaïnique des γG globulines. Pour ce faire, les fragments I, II et III sont marqués à l'I_{131} et est évalué leur passage de la cavité utérine à la circulation foetale.

Les auteurs observent qu'au bout de vingt-quatre heures, le fragment III (Fc) est transmis cinq à dix fois plus rapidement que les fragments I et II (Fab).

La digestion pepsique éliminant le fragment Fc, ils en concluent que ce fragment porte la responsabilité majeure du passage de la molécule globulinique au travers de la membrane placentaire.

Des expériences très récentes, publiées alors que nos travaux étaient en cours, ont été effectuées à l'université de Toronto :

- CONNEL et PAINTER (1966) étudient la fragmentation des immunoglobulines après vieillissement du sérum humain. Ils utilisent des γ globulines humaines et les laissent vieillir en les conservant à une température de 2°C. Les fragments obtenus à la suite de cette conservation, sont étudiés comparativement à ceux résultant de l'action du plasminogène et de la papaïne sur les mêmes globulines humaines fraîches. Leurs observations les amènent à conclure que la fragmentation produite par le vieillissement des γ globulines résultant de l'action du plasminogène est très semblable au clivage par la papaïne. Les fragments Fab sont semblables, le fragment Fc est légèrement différent, sans doute à cause d'une localisation différente du point de clivage des chaînes lourdes.

- A la suite de ces observations, PAINTER, WALCROFT et WEBER (1966), ont comparé les propriétés immunisantes d'un sérum humain frais, et donc non fractionné, avec celles d'un sérum humain fractionné par vieillissement.

Le précédent travail ayant montré que le fragment Fab du sérum vieilli conserve isolément son activité anticorps, les auteurs étudient si la réduction

de la molécule agit sur le pouvoir protecteur des immunsérums.

Ils utilisent dans leurs expériences, un sérum frais humain et un sérum conservé à 2° C, depuis trois ans.

Les cobayes immunisés par un sérum antitétanique frais, ont présenté un titre d'anticorps, au moins deux fois plus important que ceux qui ont reçu un sérum conservé.

Des singes ont reçu des préparations fraîches et conservés de sérum antipoliomyélitique par voie intramusculaire et intraveineuse. Il est à noter que les auteurs ont obtenu des courbes de concentrations sanguines très différentes suivant la voie d'administration et très superposables aux courbes que nous avons nous-même obtenues. Dans les deux voies d'administration, le titre d'anticorps obtenu avec le sérum frais est environ sept fois supérieur à celui produit par les mêmes quantités de sérum conservé.

Pour les auteurs, la baisse d'activité que présente un sérum après vieillissement, pourrait résulter du plus faible poids moléculaire des fragments, par rapport au poids moléculaire de la molécule globulinique non scindée ; ce fait laisse supposer qu'il s'agit d'une plus rapide diffusion des immunoglobulines fragmentées et de leur excrétion urinaire plus forte et plus rapide. En effet, les auteurs observent assez rapidement la présence du fragment Fab dans les urines des singes ayant reçu du sérum purifié par digestion enzymatique.

Mais divers autres arguments nous amènent à penser que cette explication n'est pas suffisante :

1) Si une question de diffusion de molécules plus petites était seule en cause, après administration intramusculaire, le titre maximum d'anticorps obtenu devrait être atteint plus rapidement avec un sérum purifié qu'avec un sérum non purifié. Or, au contraire, le sérum non purifié fournit un titre plus élevé, et dont le maximum est atteint dans les mêmes délais (cf. figure n° 18).

2) De plus, si l'élimination des globulines digérées est plus rapide, il n'y a aucun motif pour que la concentration sanguine, après injection intramusculaire, reste, pendant toute la durée de l'expérience, nettement plus basse si l'on utilise un sérum purifié ; si la diffusion des molécules digérées était plus rapide, la concentration sanguine, après injection intramusculaire devrait atteindre rapidement son maximum, pour ensuite diminuer rapidement ; et la différence entre les titres maximum d'anticorps circulants devrait être moins importante.

3) Il faut enfin noter que, dans les expériences effectuées à Toronto, les fragments étudiés sont des Fab et Fc, de poids moléculaire respectivement de 52.000 et 48.000

Or, après la digestion pepsique utilisée pour la purification des sérums, nous sommes en présence de fragments $(Fab')_2$ dont le poids moléculaire est de l'ordre de 100.000. (RELYVELD et al.-1959).

L'élimination rénale de molécules aussi volumineuses ne peut à elle seule expliquer les phénomènes observés. L'hémoglobuline, dont le poids moléculaire est de 68.000, est à la limite du passage rénal, lequel ne se produit qu'en cas de forte concentration plasmatique.

L'albumine est la première des protéines à passer dans les urines et seulement en cas d'atteinte de la perméabilité rénale. Or son poids moléculaire est de 70.000.

Dans les myélomes, on observe la présence dans les urines de globulines anormales (dimères ou monomères de chaînes légères), mais il y a alors une grave atteinte rénale.

Il est, en revanche possible que les molécules d'anticorps digérées au cours de la purification aient une durée de vie moins longue que celle des anticorps non digérés : une étape importante du processus de leur catabolisme ayant déjà eu lieu. L'élimination des anticorps digérés serait donc d'emblée plus rapide que celle des anticorps non digérés.

La diminution du poids moléculaire des fragments globuliniques résultant de la purification pourrait permettre d'élucider le pouvoir protecteur plus important des sérums non digérés que nous avons observé au cours de nos expériences.

Mais la perte du fragment Fc nous semble également contribuer à une moins grande possibilité de diffusion dans l'organisme si l'on tient compte du fait qu'il porte les sites de diverses activités assurant la fixation sur les tissus et le passage de la barrière placentaire.

CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de nos expériences, nous ont montré que :

- l'administration par voie veineuse d'un sérum antidiphtérique, apporte d'emblée à l'organisme une immunité plus forte et au moins aussi durable que l'administration d'une même quantité de sérum par voie intramusculaire.

- l'utilisation d'un sérum antitoxique non purifié par digestion enzymatique apporte, dans la circulation, un titre d'antitoxine plus élevé et nettement plus durable que l'emploi d'un sérum purifié, dans les mêmes conditions d'expériences.

- le passage des anticorps antitoxiques par voie rectale, sous forme de suppositoires, s'est montré nul ou extrêmement faible.

Nous pouvons, dans la pratique, en tirer les conclusions suivantes :

1) Si, dans un but curatif, on doit administrer un sérum antitoxique dont on cherche une action aussi immédiate que possible, on aurait intérêt à administrer le sérum par voie veineuse tout au moins à chaque fois que le sujet ne présente pas d'hypersensibilité marquée. Ceci, pour deux raisons :

- les sérums thérapeutiques sont presque toujours purifiés. Or, nous avons établi que la purification fournissait des produits à diffusion plus lente que les sérums non purifiés. On devrait, de préférence, choisir la voie de pénétration présentant le moins d'obstacle à la diffusion du sérum.

- la voie veineuse amène immédiatement un titre maximum en antitoxine circulante. Nous avons vu qu'il suffit de prendre les précautions usuelles, et, d'éviter par un test préalable les risques d'accidents allergiques.

Rappelons que ce mode d'administration par voie veineuse est pratiqué de façon systématique, par les médecins hollandais, sans que ceux-ci aient observé d'inconvénient. (TASMAN et MINKENHOFF 1959).

2) La voie rectale d'administration des sérums antitoxiques ne semble pas permettre une application curative.

Tout au plus trouverait-elle une utilisation préventive, si l'on met en œuvre les doses massives d'anticorps apportées par un sérum antitoxique non purifié. Elle pourrait aussi être utilisée à titre d'appoint et d'entretien d'un traitement d'attaque par voie parentérale.

Que la sérothérapie soit menée par voie veineuse ou musculaire, il est inconcevable d'administrer des sérums antitoxiques non purifié. Les risques alors encourus seraient beaucoup trop graves, en égard à l'accroissement de l'immunité obtenue.

En revanche, considérant la supériorité des sérums non digérés quant à l'immunité produite, il serait intéressant d'étudier des moyens de purification, autres que la digestion enzymatique qui seraient capables d'isoler, sous forme hautement purifiée, les anticorps antitoxiques ou autres. Citons, par exemple, les purifications par précipitations salines, ou par tamisage moléculaire à l'aide de filtration sur gel de dextrane (Sephadex).

L'emploi de sérums non digérés nous semble particulièrement indiqué quand il s'agit d'obtenir une action de longue durée. Nous pensons que l'administration de sérums antilymphocytaires hétérologues, dans le but de créer un état prolongé d'immuno-dépression, pourrait avantageusement utiliser de tels sérums purifiés par des procédés non enzymatiques.

BIBLIOGRAPHIE

AMOUREUX, G. et YEU, F. (1951), Ann. Inst. Pasteur, **80,** 165.

ARDRY, R., COURTIN, A. (1961), Thérapie, **16,** 827.

BEHRING, E. von et KITASATO, S. (1890), Dtsch. méd. WSchr., **16**, 1145.

BOYD, W.C., "**Fundamentals of Immunology**", 3ème Edition, Interscience Publishers Inc., New-York, (1956).

BRAMBELL, F.W.R., F.R.S., HEMMINGS, W.A. et OAKLEY, C.L., F.R.S.(1959), Proc. Roy. Soc., Ser. B, **150.**

BRAMBELL, F.W.R., F.R.S., HEMMINGS, W.A., et OAKLEY, C.L., F.R.S., (1960), Proc. Roy. Soc., Ser. B., **151.**

Bull. Org. Mond. Santé,(1964),**30**, 447-450.

Bull. Org. Mond. Santé,(1968), **38**, 479-480.

CONNEL, G.E., PAINTER, R.H.(1966), Canad. J. Biochem., **44**, 371.

DEUTSCH, H.F. et NICHOL, J.C. (1948) J. Biol. Chem., **176**, 797.

EDELMAN, G.M., et POULNIK, M.D. (1961) J. Exp. Méd., **113**, 861.

FLEISCHMAN, J.B., PAIN, R.H. et PORTER, R.R. (1962) Arch. Biochem. Biophys., **I**, suppl., 174.

FRAZER, D.T. et WIGHAM, H.E. (1924) J. Amer. med. Ass., **82**, 1114.

GOULLET, Ph. (1965) Presse méd., **73**, 1349.

HAMBURGER, J., LAPLANE, R., MARTIN, R., MARIE, J., SIGUIER, F. (1959) Presse méd., **67**, 1363.

HOLT, L.B. (1950) "**Developments in diphtheria prophylaxis**", W. Heineman. Medical Books, London.

KEKWICK, R.A.(1941), Chem. Industr., **60**, 486.

KEKWICK, R.A. et RECORD, B.R.(1941), Brit. J. Exp. Path., **22**, 29.

LEMETAYER, E.(1935), C.R. Soc. Biol. (Paris), **119**, 53.

MAMOU, H.(1962), Sem. Thérapeutique, **38**, 42.

MAMOU, H.(1963), Sem. Thérapeutique, **39**, 336.

MUELLER, J. H., MILLER, P.A.(1941), J. Immunol., **40**, 21.

NISONOFF, A., WISSLER, F.C., LIPMAN, N.L. et WOERNLY, D.L.,(1960), Arch. biochem. Biophys., **89**, 230.

NISONOFF, A. et RIVERS, M.M.(1961), Arch. Biochem. Biophys., **93**, 460.

PAINTER, R.H., WALCROFT, M.J. et WEBER, J.C.W.(1966), Canad. J. Biochem., **44**, 381.

Pharmacopoea Internationalis. Editio Prima. Volumen I.p. 340-344.

POPE, C.G. (1938), Brit. J. exp. Path., **19**, 245.

POPE, C.G. (1939 a), Brit. J. exp. Path., **20**, 132.

POPE, C.G. (1939 b), Brit. J. exp. Path., **20**, 201.

PORTER, R.R. (1959), Biochem. J., **73**, 119.

PORTER, R.R. (1960), "γ **globulin and antibodies in the Plasma Proteins**", Academic. Press., Edit., New-York, **I**, 241.

PORTER, R.R. (1963), Brit. Med. Bull., **19**, 197.

RAYNAUD, M., RELYVELD, E.H., GIRARD, O. et CORVAZIER, R. (1959), Ann. Inst. Pasteur, **96**, 649.

RELYVELD, E.H., TURPIN, A., LAFAILLE, A., PARIS, C. et RAYNAUD, M. (1954), Ann. Inst. Pasteur, **87**, 301.

RELYVELD, E.H., (1959) "**Toxine et Antitoxine Diphtérique**. Etude Immunologique". Ed. Hermann, Paris.

RELYVELD, E.H., TRIET, A.J. van et RAYNAUD, M. (1959), Antonie v. Leeuwenhoek, **25**, 369.

RÖMER, P.H. et SAMES, Th. (1909), J. Immun. Forsch., **3**, 344.

SCHEER, J. (van der) et WYCKOFF, R.W.G. (1940 a), Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y), **43**, 427.

SCHEER, J. (van der) et WYCKOFF, R.W.G. (1940 b), Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y), **45**, 634.

SCHEER, J. (van der), WYCKOFF, R.W.G. et CLARKE, F.H. (1941), J. Immunol., **41**,173.

TASMAN, A., MINKENHOFF, J.E., BRANDWIJK, A.C. et SMITH, L. (1954), Ned. Tijdschr. Geneesk., **98**, 3388.

TASMAN, A., MINKENHOFF, J.E., BRANDWIJK, A.C. et SMITH, L. (1955), Antonie v. Leeuwenhoek, **21**, 193.

TASMAN, A., MINKENHOFF, J.E., VINK, H.H., BRANDWIJK, A.C. et SMITH, L., (1958), Antonie v. Leeuwenhoek, **24**, 161.

TASMAN, A., MINKENHOFF, J.E., (1959), Presse méd., **67**, 1919.

TISELIUS, A. et KABAT, E.A. (1939), J. exp. Med., **69**, 119.

YEU, F. et PAVAGEAU, D. (1956), Ann. Inst. Pasteur, **90**, 240.